

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA POVŠE

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA POVŠE

**PRIMERJAVA TITRACIJE IN TEKOČINSKE KROMATOGRFIJE VISOKE
LOČLJIVOSTI ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI VITAMINOV B**

**COMPARISON OF TITRIMETRY AND HIGH-PRESSURE LIQUID CROMATOGRAPHY
FOR QUANTIFICATION OF VITAMINS B**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek d.d., v Razvojnem centru, na Oddelku Analitska podpora v Ljubljani, pod mentorstvom izr. prof. dr. Zdenka Časarja in somentorstvom Andreje Jamšek univ. dipl. kem..

Za usmerjanje in pomoč pri pisanju magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Zdenku Časarju in somentorici Andreji Jamšek, univ. dipl. kem.. Hvala vama za vso prijaznost in strokovno pomoč pri pisanju.

Zahvaljujem se tudi farmacevtski družbi Lek d.d., ki mi je omogočila opravljanje praktičnega dela magistrske naloge. Posebna zahvala je namenjena sodelavcu Davorju Štirnu za vso pomoč pri izvedbi in pisanju magistrske naloge.

Hvala tudi vsem ostalim sodelavkam in sodelavcem v Razvojnem centru podjetja Lek ter moji družini in prijateljem, ki so me tekom študija in pisanja magistrske naloge vseskozi podpirali in mi pomagali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Zdenka Časarja in somentorstvom Andreje Jamšek univ. dipl. kem..

VSEBINA

POVZETEK.....	III
ABSTRACT.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 VITAMINI B-KOMPLEKSA.....	1
1.1.1 VITAMIN B1 – TIAMIN	2
1.1.2 VITAMIN B6 – PIRIDOKSIN	3
1.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI	3
1.3 KROMATOGRAFSKE METODE.....	4
1.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)	5
1.4.1 HPLC SISTEM	6
1.5 VOLUMETRČNE METODE (TITRACIJE).....	11
1.5.1 VRSTE TITRACIJ	12
1.6 VALIDACIJA ANALITSKIH METOD.....	12
1.6.1 VALIDACIJSKI PARAMETRI.....	13
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.2 METODE.....	18
3.2.1 DOLOČANJE VSEBNOSTI ANALITOV S TITRACIJAMI.....	18
3.2.1.1 Priprava sistema	18
3.2.1.2 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida (26).....	19
3.2.1.3 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida (26).....	20
3.2.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI ANALITOV Z METODAMI HPLC	21
3.2.2.1 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida (27).....	22
3.2.2.2 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida (27).....	23
3.2.3 VALIDACIJA TITRACIJSKIH METOD ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI.....	25
3.2.3.1 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida in tiaminijevega klorida.....	27
3.2.4 VALIDACIJA HPLC METOD ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI.....	30
3.2.4.1 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida in tiaminijevega klorida.....	30

4	REZULTATI IN DISKUSIJA	37
4.1	DOLOČANJE VSEBNOSTI PIRIDOKSINIJEVEGA KLORIDA	37
4.1.1	PODAJANJE REZULTATOV VALIDACIJE	37
4.1.2	NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)....	37
4.1.3	TOČNOST METODE.....	39
4.1.4	LINEARNOST METODE	41
4.1.5	ROBUSTNOST METODE (STABILNOST RAZTOPIN VZORCEV IN STANDARDOV).....	45
4.1.6	SELEKTIVNOST/SPECIFIČNOST METODE	48
4.2	DOLOČANJE VSEBNOSTI TIAMINIJEVEGA KLORIDA.....	51
4.2.1	PODAJANJE REZULTATOV VALIDACIJE	51
4.2.2	NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)....	52
4.2.3	TOČNOST METODE.....	53
4.2.4	LINEARNOST METODE	56
4.2.5	ROBUSTNOST METODE (STABILNOST RAZTOPIN VZORCEV IN STANDARDOV).....	60
4.2.6	SELEKTIVNOST/ SPECIFIČNOST METODE	63
5	SKLEP.....	66
6	LITERATURA.....	68

POVZETEK

Določanje vsebnosti zdravilnih učinkovin in vitaminov je pomembno za zagotavljanje učinkovitosti in varnosti zdravil in prehranskih dopolnil. Vodilna analitska metoda pri tem je nedvoumno tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Preostanek predstavljajo še nekatere druge analitske metode, med njimi tudi titracije. V farmacevtski industriji je zelo pomembno, da so te analitske metode validirane, saj s tem zagotovimo skladnost, zanesljivost in točnost podatkov.

V okviru magistrske naloge smo izvedli primerjavo že obstoječih farmakopejskih metod za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida (vitamin B1) in piridoksinijevega klorida (vitamin B6). Primerjali smo titracijsko metodo, ki je kot metoda za določanje vsebnosti obeh analitov predpisana po evropski farmakopeji in HPLC metodo, ki je predpisana po ameriški farmakopeji. Namen naše magistrske naloge je bil namreč ugotoviti, katera od omenjenih analitskih metod je za določanje vsebnosti izbranih analitov bolj primerna tako z ekonomskega kot tudi s kakovostnega vidika oz. natančnosti. Najprej smo pregledali farmakopejske analitske metode za določanje vsebnosti obeh vitaminov, nato pa smo izvedli validacijo posameznih analitskih metod. Analizirali smo validacijske parametre: natančnost znotraj enega dne, linearnost, točnost, robustnost in selektivnost oz. specifičnost analitske metode.

Glede na izbrane validacijske kriterije smo ugotovili, da so vse 4 analitske metode natančne, točne v območju 80 % – 120 % ciljne koncentracije analitov in linearne v območju 50 % – 150 % ciljne koncentracije analitov. Pri obeh analitih smo ugotovili, da je HPLC boljše metodo za napovedovanje stabilnosti raztopin vzorcev in standardov v primerjavi s titracijo. HPLC metoda je tudi bolj selektivna. V splošnem so bili rezultati med posameznima analitskima metodama za vsak analit med seboj primerljivi, zato lahko zaključimo, da sta obe analitski metodi primerni oz. ustrezni za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida in tiaminijevega klorida.

Ključne besede: HPLC, titracija, validacija, tiaminijev klorid, piridoksinijev klorid

ABSTRACT

Assay determination of active substances and vitamins is important to ensure the efficacy and safety of medicines and dietary supplements. The leading analytical method in this field is high performance liquid chromatography (HPLC), and other following analytical methods, including titration. In the pharmaceutical industry, it is very important that these analytical methods are validated, to ensure consistency, reliability and accuracy of the data.

In master's thesis, we compared the already existing pharmacopoeia methods for assay determination of thiamine hydrochloride (vitamin B1) and pyridoxine hydrochloride (vitamin B6). We compared the titration, which is prescribed as a method for assay determination of both analytes by the European Pharmacopoeia and the HPLC method prescribed by the American Pharmacopoeia. The aim of our master's thesis was to determine which of the used analytical methods for assay determination of selected analytes is more appropriate from economic and qualitative aspects. In the first part we reviewed the pharmacopoeia analytical methods for assay determination of both vitamins, then we performed the validation of each of the analytical methods. During the master's thesis the following validation parameters were tested: intraday precision, linearity, accuracy, robustness and selectivity/ specificity of the analytical method.

According to the selected validation criteria, we found that all 4 analytical methods are precise, accurate in the range of 80 % - 120 % of the target concentrations of analytes and linear in the range of 50 % - 150 % of the target concentrations of analytes. For both analytes, HPLC was found to be a better method for prediction of the stability of sample and standard solutions compared to titration. The HPLC method is also more selective. In general, the results for each analyte between the individual analytical methods were comparable, so we have concluded that both analytical methods are suitable for assay determination of pyridoxine hydrochloride and thiamine hydrochloride.

Keywords: HPLC, titration, validation, thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	površina kromatografskega vrha
DPV	dodatno prečiščena voda
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti/ <i>angl. High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	mednarodna konferenca o usklajevanju/ <i>angl. International Conference on Harmonisation</i>
IPS	izguba pri sušenju
IS	interni standard
KF	Karl-Fischer metoda
LC	tekočinska kromatografija/ <i>angl. Liquid Chromatography</i>
MF	mobilna faza
PhEur	evropska farmakopeja/ <i>angl. European Pharmacopeia</i>
r	korelacijski koeficient
T	temperatura
USP	ameriška farmakopeja/ <i>angl. United States Pharmacopeia</i>

1 UVOD

Vitamini (A, D, E, K, C in B-kompleks) so skupina mikrohranil, pomembnih za normalno rast in razvoj živih bitij. Sodelujejo kot koencimi ali antioksidanti in vplivajo na genetske regulacijske procese (1). Vitamini so del prehranskih dopolnil, ki ohranjajo zdravo življenje. Glavni analitski izzivi oz. težave pri uporabi vitaminov oz. njihovi vgradnji v farmacevtske pripravke so (2):

- da so običajno prisotni v zelo majhnih koncentracijah
- da so lahko prisotni v različnih kemijskih, vendar biološko neaktivnih oblikah
- da so nekateri od njih občutljivi na toploto, visoke pH vrednosti in na encime
- da ne obstaja ustrezen analitski pristop, s katerim bi (v biološkem smislu) vitamine lahko količinsko ovrednotili.

Glede na topnost lahko vitamine razdelimo v dva razreda, in sicer na vitamine topne v maščobah (A, D, E, K) in vitamine topne v vodi (B-kompleks) (2).

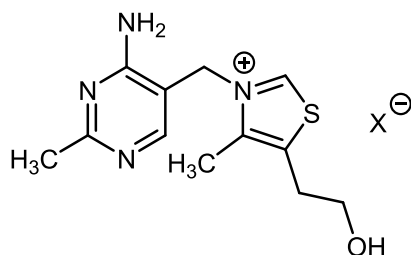
Osredotočili se bomo na vitamine B-kompleksa oz. nekatere predstavnike te skupine.

1.1 VITAMINI B-KOMPLEKSA

B-kompleks je skupno ime za skupino vodotopnih vitaminov, ki imajo kemijsko zelo raznoliko strukturo. Glavni predstavniki te skupine so tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), vitamin B4 in piridoksin (B6) (1).

Vitamini B-kompleksa pomagajo vzdrževati koencimske funkcije v metabolizmu aminokislin, ogljikovih hidratov, glikogena in številnih oksidacijskih in redukcijских reakcij. Pomanjkanje teh vitaminov se izraža v številnih boleznih, kot so beriberi, periferna nevropatija, pelagra, peroralne in genitalne lezije. Če človeški metabolizem ni zmožen sintetizirati zadostne količine teh vitaminov, je treba te spojine pridobiti s hrano, prehranskimi dopolnili ali z zdravili. Izločanje vitaminov poteka z urinom in skozi znoj (1). V preteklosti so vitamine B-kompleksa določali z mikrobiološkimi testi, v današnjem času pa se zato uporabljajo boljše metode npr. tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), radioimunološka analiza in encimsko imunoadsorpcijski test. Vse več se uporablja tudi masna spektrometrija v kombinaciji z drugimi tehnikami (2).

1.1.1 VITAMIN B1 – TIAMIN

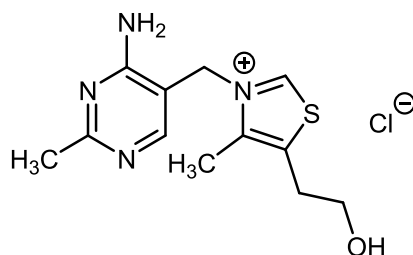


Slika 1: Kemijska struktura tiamina.

Vitamin B1 oz. tiamin je vodotopna, termostabilna, kristalinična spojina, občutljiva na ultravijolično svetlobo, slabo stabilna je tudi v nevtralnem in alkalnem okolju. Kemijsko je tiamin sestavljen iz pirimidinskega obroča in tiazola s kvarternim dušikom, povezuje pa ju metilenski mostiček (slika 1) (3).

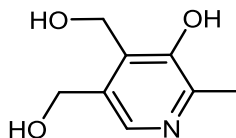
Vitamin B1 se nahaja praktično v vseh rastlinskih in živalskih tkivih, v večjih količinah pa je prisoten npr. v kvasu in v drugih žitaricah (3). Tiamin se hitro in aktivno absorbira iz tankega črevesja in se znotraj telesa preko fosforilacije pretvori v aktiven koencim tiamin pirofosfat (4). Ta ima pomembno vlogo v encimskih reakcijah Krebsovega cikla. Vitamin B1 ima pomembno funkcijo tudi pri sintezi različnih živčnih prenašalcev, nukleinskih kislin, lipidov in nekaterih aminokislin (5). Pomanjkanje vitamina se pri ljudeh izraža v depresiji, razdražljivosti, težavah pri koncentraciji in pomanjkanju spomina. Spremembe so prisotne tudi v perifernem živčnem sistemu, navzven se to odraža v bolečinah v mišicah. Motnje se odražajo tudi v presnavljanju ogljikovih hidratov, hujšanju, lahko pa pride tudi do okvar srca. Veliko pomanjkanje vitamina B1 je vzrok za bolezen beriberi, kjer je prizadeto celotno tkivo (4, 6).

V nadaljevanju pri izvedbi eksperimentalnega dela bomo kot analit za določanje vsebnosti uporabili tiaminijev klorid (slika 2).



Slika 2: Kemijska struktura tiaminijevega klorida.

1.1.2 VITAMIN B6 – PIRIDOKSIN

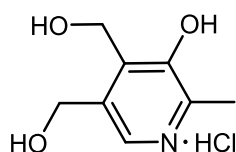


Slika 3: Kemijska struktura piridoksina.

Vitamin B6 je vodotopen vitamin, ki je naravno prisoten v različni hrani in prehranskih dodatkih. B6 je skupno ime za 6 spojin: piridoksin (alkohol), piridoksal (aldehid), piridoksamin (vsebuje amino skupino) in njegov 5-fosfatni ester. Piridoksal-5-fosfat in piridoksamin-5-fosfat sta aktivna koencima vitamina B6 (7).

Piridoksin (slika 3) se naravno nahaja v sadju, zelenjavi in žitaricah. Človeško telo absorbira vitamin B6 v tanko črevo, pri katerem se fosforilirana oblika vitamina defosforilira, prost vitamin B6 pa se absorbira s pasivno difuzijo (7). Vitamin B6 sodeluje pri več kot 100 encimskih reakcijah povezanih s presnovo beljakovin, ogljikovih hidratov in lipidov. Pomembno vlogo ima tudi pri kognitivnem razvoju in nastajanju hemoglobina. Pomanjkanje vitamina je povezano s srčno-žilnimi boleznimi, vitamin B6 je namreč potreben za presnovo homocisteina, ki je neodvisni kazalnik tovrstnih bolezni. Poleg tega ima določitev piridoksina pomembno vlogo pri diagnosticiranju sumov podhranjenosti pri hospitaliziranih, hiperhomocisteinemičnih ali starejših bolnikih (7, 8).

V nadaljevanju pri izvedbi eksperimentalnega dela bomo kot analit za določanje vsebnosti uporabili piridoksinijev klorid (slika 4).



Slika 4: Kemijska struktura piridoksinijevega klorida.

1.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI

Na področju analize zdravil in prehranskih dopolnil (kot so vitamini) je zelo pomembno področje analizno preizkušanje vhodnih surovin, vmesnih produktov sinteze, formulacij zdravil, nečistot in razkrojnih produktov ter bioloških vzorcev, med samim procesom razvoja zdravil. Namen takšnih testiranj je pridobiti podatke, ki lahko prispevajo k visoki

kakovosti, učinkovitosti in varnosti terapije z zdravili, pa tudi k večji gospodarnosti med proizvodnjo zdravil (9).

Določanje vsebnosti zdravilnih učinkovin je zelo pomembna metoda v farmacevtski industriji in v medicinski diagnostični industriji. Vsebnost je glede na farmacevtsko-terminološki slovar definirana kot »količina, navadno učinkovine v zdravilu, polizdelku ali surovini za zdravilo, izražena kot masa, delež mase, volumen« (10). Glede na farmakopejske predpise vsebnost učinkovine oz. preiskovanega analita podajamo na suho snov (pri tem je potrebno upoštevati odstotek izgube pri sušenju) ali na brezvodno snov (upoštevati moramo vsebnost vode v preiskovanem analitu). Specifikacijske meje so strogo predpisane v farmakopejah, za vsak analit posebej, odvisne pa so tudi od izbora analitske metode (11). Vodilna metoda pri določanju vsebnosti je nedvomno HPLC, ki se uporablja v več kot 50 %, preostanek predstavljajo še ostale kromatografske metode (npr. plinska in tankoplastna kromatografija), spektroskopske metode in elektroanalitske metode, med katere prištevamo tudi titracije (9). V splošnem so za določanje vsebnosti s klasičnimi metodami titriranja pogosto predpisane specifikacijske meje 99 – 101 %, pri spektroskopskih (UV) metodah so običajno meje nekoliko širše, tj. 97 – 103 % pri tekočinskih kromatografskih metodah (npr. HPLC) pa 98 – 102 % (11). V nadaljevanju se bomo podrobneje osredotočili na kromatografske metode, predstavili pa bomo tudi volumetrične (titracijske) metode.

1.3 KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografija je glede na farmacevtsko-terminološki slovar definirana kot skupno ime za analizne in tehnološke postopke za ločevanje, čiščenje ali izolacijo posameznih komponent iz raztopin ali plinov na trdnem nosilcu na podlagi razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih (10). Osnovni princip kromatografskega ločevanja je v različnih hitrostih potovanja posameznih komponent s tokom mobilne faze kot posledica selektivnega zadrževanja komponent na stacionarni fazi kolone (12).

Primarno se kromatografija uporablja za ločitev komponent v vzorcu. Pri tem se le te porazdelijo med dve fazi - stacionarno in mobilno fazo. Stacionarna faza je tista, ki vseskozi ostaja na istem mestu oz. se ne premika, medtem ko mobilna faza potuje skozi sistem. Stacionarna faza je v trdnem agregatnem stanju in je v koloni (kolonska kromatografija) ali pa je razpršena kot tanka plast oz. film (planarna kromatografija) (13). Mobilna faza pa je plinasta ali tekoča, zato kromatografijo v splošnem (glede na agregatno

stanje mobilne faze) razdelimo tudi na tekočinsko in plinsko kromatografijo. Med tekočinsko kromatografijo uvrščamo tudi tankoplastno kromatografijo in kapilarno elektrokromatografijo (14).

V nadaljevanju se bomo osredotočili na tekočinsko kromatografijo, ki je dandanes najbolj uporabljena kvalitativna in kvantitativna kromatografska tehnika za določitev komponent v farmacevtskih in bioloških pripravkih.

1.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je tehnika v analizni kemiji, ki jo uporabljamo za ločevanje, identifikacijo in kvantifikacijo posameznih komponent v zmesi. Njena prednost pred ostalimi kromatografskimi tehnikami je v tem, da ima večjo sposobnost ločevanja, hitrejši čas ločbe, boljše ponovljivost in večjo občutljivost detekcije (15).

Princip delovanja je v tem, da preiskovano zmes vzorca najprej raztopimo v topilu in jo nato pod visokim tlakom, ki ga omogoča črpalka, potiskamo skozi kolono (s pomočjo mobilne faze), ki je napolnjena s trdnim adsorbentnim materialom. Vsaka komponenta v vzorcu različno reagira s tem adsorpcijskim materialom, kar posledično povzroča različno hitrost potovanja skozi kolono oz. ločevanje komponent. Glavni cilj kromatografije je namreč ustrezno ločiti posamezne komponente vzorca, ter jih nato z izbranim detektorjem ustrezno kvantitativno oz. kvalitativno opredeliti (15).

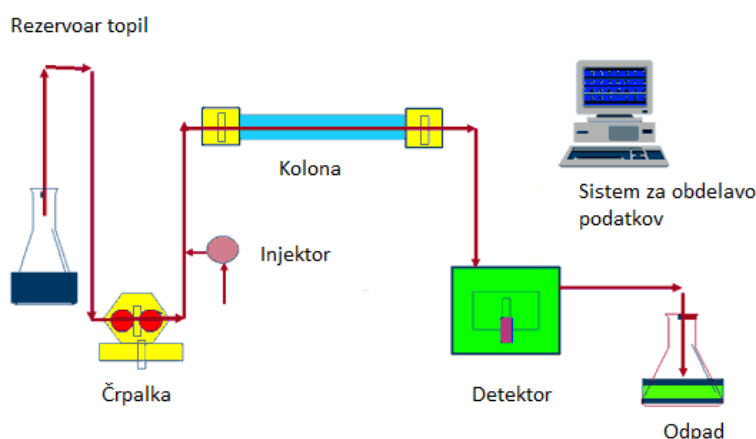
Glede na mehanizem ločevanja komponent v vzorcu oz. interakcije med stacionarno fazo in analitom ločimo tri osnovne metode tekočinske kromatografije: porazdelitveno, ionsko-izmenjevalno in izločitveno kromatografijo (14, 15).

Pri **porazdelitveni kromatografiji** ločimo dva načina: normalno-fazno in reverzno-fazno kromatografijo. Če je stacionarna faza (npr. silikagel) bolj polarna od mobilne (npr. toluen, etileter, kloroform, *n*-heksan) govorimo o normalno-fazni kromatografiji. Ta tip porazdelitve je primeren za ločevanje od srednje do močno polarnih analitov. V nasprotnem primeru, ko je stacionarna faza (npr. fenil) bolj nepolarna od mobilne faze (npr. voda, acetonitril, metanol), pa je tekočinska kromatografija reverzno-fazna. Slednja je ustrezna za ločevanje vzorcev, ki so manj polarni (14).

Ionsko-izmenjevalna kromatografija je osnovana na ionskih interakcijah med analitom in stacionarno fazo. Ločevanje komponent v tem primeru poteka na osnovi različne afinitete ionskih analitov do površine stacionarne faze (14).

Posebna vrsta je **izločitvena kromatografija**, kjer ločevanje poteka glede na različno velikost molekul vzorca in por v stacionarni fazi. Pri tej metodi je bistvenega pomena inertnost in fizikalne lastnosti stacionarne faze (14).

1.4.1 HPLC SISTEM



Slika 5: HPLC sistem (prirejeno po 16).

Glavne komponente HPLC sistema so: rezervoar topil, črpalka, injektor, kolona, detektor in sistem za obdelavo podatkov (slika 5) (14).

Rezervoar topil (oz. mobilne faze) potrebujemo za shranjevanje zadostne količine ustreznih topil za neprekinjeno delovanje sistema. Pred uporabo je treba mobilno fazo obvezno filtrirati (skozi filter 0,22 ali 0,45 μm) in razpliniti, saj s tem odstranimo zračne mehurčke, ki bi lahko motili ali celo ustavili delovanje inštrumenta med analizo. To lahko dosežemo z ultrazvokom, vakuumsko črpalko ali pa s prepihanjem s helijem oz. argonom. Pri izbiri topil je pomembno, da se mešajo med seboj, imajo nizko viskoznost, so kompatibilna z detektorjem, in da kemijsko ne reagirajo s stacionarno fazo (14, 17).

Črpalka omogoča visok tlak (do 400 barov), ki je potreben za premagovanje upora pri pretoku mobilne faze skozi kolono. Obstaja več vrst črpalk, pri čemer je najpogosteje v uporabi batna črpalka, ki povzroča pulzne signale na detektorju zaradi nihanja tlaka. V kolikor črpalka celoten čas do kolone dostavlja mobilno fazo s konstantno sestavo,

govorimo o izokratski eluciji. V nasprotnem primeru, ko se sestava mobilne faze med kromatografijo s časom spreminja, pa je elucija gradientna. V tem primeru črpalka črpa tekočino iz dveh ali več rezervoarjev mobilnih faz in jih nato med kromatografijo meša oz. združuje v ustreznem razmerju. Črpalka zagotavlja tudi konstanten pretok mobilne faze skozi kolono (17).

Injektor omogoča injiciranje določene količine raztopine preiskovanega vzorca v tok mobilne faze, še preden ta vstopi v kolono. Zelo pogosto so v uporabi vrtljivi injektorji z zanko s stalnim volumnom (*angl. "loop injection"*). Večinoma se uporabljajo v kombinaciji z avtomatskimi vzorčevalniki, pri katerih so raztopine vzorcev napolnjene v vialo in postavljene v vzorčevalnik, ki raztopine nato samodejno injicira v sistem po predhodno nastavljenem vrstnem redu (14, 17).

Kolona je glavni del HPLC sistema, saj na njej poteka ločevanje komponent v vzorcu. Običajno so HPLC kolone 15 – 25 cm dolge jeklene cevke z notranjim premerom 4,6 mm. Premer delcev, s katerimi so napolnjene, v notranjosti znaša 3–10 μm , pogosto pa uporabljamo tudi delce, ki so manjši od 3 μm . Poleg kolone je preventivno priporočljiva uporaba predkolone, saj z njo preprečimo dostop kontaminantov do kolone ter tako podaljšamo življenjski čas kolone (17).

Detektor omogoča identifikacijo in kvantifikacijo posameznih komponent, ki so se ločile v koloni. Njegovo delovanje temelji na merjenju spremembe fizikalne količine, ki je posledica prehoda analita skozi merilno pretočno celico detektorja. Detektor to spremembo pretvori v ustrezen električni signal.

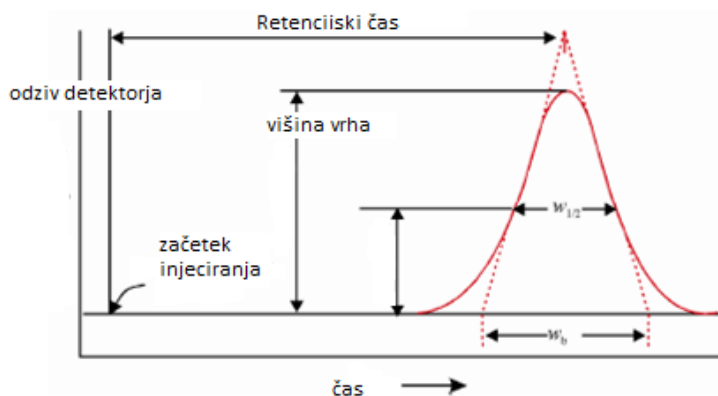
Ločimo:

- *Univerzalne detektorje*: merijo kakršnokoli spremembo fizikalne količine (gostota, lomni količnik, dielektrična konstanta) v mobilni fazi, ki se spremeni zaradi prisotnosti vzorca. Slabost takšnih detektorjev je nizka občutljivost.
- *Specifične detektorje* (npr. fluorescenčni, UV–VIS, masni, elektrokemijski): odzovejo se na točno določeno lastnost učinkovine v vzorcu (npr. fluorescenca, absorbanca). Slabost tovrstnih detektorjev je, da so občutljivi le na določene kemijske spojine.

Najpogosteje v farmacevtski industriji uporabljamo UV–VIS detektorje, katerih delovanje temelji na absorpciji ultravijolične in vidne svetlobe. V kolikor jih primerjamo s fluorescenčnimi in elektrokemijskimi detektorji, imajo slednji (fluorescenčni in elektrokemijski) za nekatere analite veliko nižjo mejo detekcije, medtem ko masni spektrometer poda tudi informacijo o molekularni strukturi spojine. Refraktometer uporabljamo v primeru, ko spojina nima ustreznega UV odziva, njegova slabost pa je, da je precej manj občutljiv in zato ni primeren za metode z gradientno elucijo. Uporabljamo lahko tudi kombinacijo več različnih detektorjev (17).

Sistem za obdelavo podatkov omogoča ustrezno vrednotenje električnih signalov, ki jih pretvarja detektor. Ti podatki so shranjeni na računalniku in z ustrezno programsko opremo lahko tako ovrednotimo rezultate (14).

Kot končni rezultat dobimo kromatogram (slika 6). Kromatogram je grafična predstavitev odziva detektorja oz. predstavitev rezultatov kromatografije v obliki diagrama (11). Na kromatogramu pridobimo informacije o kvantitativni sestavi (položaj vrhov), kompleksnosti (število vrhov) vzorca in količini posameznih komponent v vzorcu (površina pod vrhom). Signal, prikazan na kromatogramu, predstavlja funkcijo gibanja (časa ali volumna) dodane mobilne faze (18).



Slika 6: Kromatogram (prirejeno po 19).

Glavni namen oz. cilj vsake kromatografije je torej ločitev kromatografskih vrhov.

Osnovni teoretski pojmi (20, 21), ki jih pri tem uporabljamo, so:

- **retencijski čas (t_R):** specifičen čas (izražen v minutah), ki ga potrebuje posamezna komponenta za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono.
- **retencijski volumen (V_R):** volumen mobilne faze, ki je potreben, da se določena komponenta izpere iz kolone. Izračunamo ga kot produkt med t_R (min) in Q , kjer Q pomeni pretok mobilne faze (mL/min).
- **višina kromatografskega vrha (h):** izmerjena razdalja od geometrijsko narisane bazne linije do maksimalne točke kromatografskega vrha.
- **širina kromatografskega vrha na bazni liniji (w):** razdalja med točkama (izražena v min) na bazni liniji, kjer tangenti kromatografskega vrha sekata geometrijsko narisano (navidezno) bazno linijo. Pomembna je tudi **širina na polovični višini kromatografskega vrha (w_h)**.

Retencijski faktor oz. kapacitivnost kolone (k') podaja razmerje med časom, ko se neka komponenta zadržuje na stacionarni fazi (t_R) in časom, ko potuje skozi mobilno fazo (t_0). Izračunamo ga po *enačbi 1*.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Enačba 1: Izračun retencijskega faktorja.

Selektivnost kolone (α) predstavlja zmožnost kolone, da loči dve komponenti. Izračunamo jo kot količnik med retencijskima faktorjema dveh komponent po *enačbi 2*.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Enačba 2: Izračun selektivnosti kolone.

Število teoretskih podov (N) je merilo za učinkovitost kolone. Predstavlja število porazdelitev topljenca med mobilno in stacionarno fazo pri prehodu skozi kolono. Izračunamo ga po *enačbi 3*.

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

Enačba 3: Izračun števila teoretskih podov.

Faktor ločljivosti (R_s) je kvantitativno merilo kakovosti ločbe dveh komponent. V splošnem je ločljivost zadovoljiva takrat, ko so komponente med seboj ločene v čim krajšem času, in sicer mora biti razdalja med dvema vrhovoma večja od njune širine. Izračunamo ga po *enačbi 4*.

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

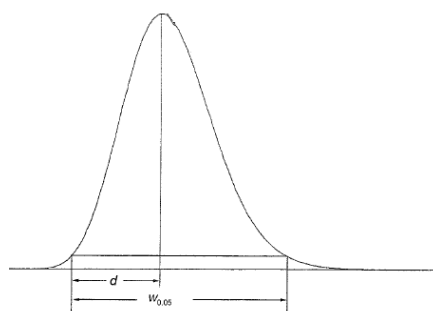
Enačba 4: Izračun faktorja ločljivosti.

Ločljivost (R) opisuje stopnjo ločbe dveh komponent. Izračunamo jo tako, da razliko med retencijskima časoma dveh komponent delimo s širino obeh zaporednih kromatografskih vrhov na bazni liniji. Vse skupaj na koncu pomnožimo z 2 (*enačba 5*).

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1}$$

Enačba 5: Izračun ločljivosti.

Faktor simetrije (A_s , T) opisuje simetričnost kromatografskega vrha (slika 7). Izračunamo ga po *enačbi 6*, pri katerem vrednost 1,0 pomeni popolno simetričnost kromatografskega vrha. Pri vseh ostalih vrednostih je kromatografski vrh asimetričen. Če je $A_s > 1$, govorimo o »*tailing*« učinku kromatografskega vrha (slika 7), kjer je prednji del kromatografskega vrha bolj strm od zadnjega dela. V nasprotnem primeru ($A_s < 1$), kjer je prednji del vrha manj strm od zadnjega dela, pa je to »*fronting*« kromatografskega vrha.



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

Slika 7 (levo) in Enačba 6 (desno): Izračun faktorja simetrije. $w_{0,05}$ pomeni širino vrha na 1/20 višine vrha; d pomeni razdaljo od maksimalne višine vrha do začetka vrha, izmerjeno na 1/20 višine vrha (prirejeno po 21).

1.5 VOLUMETRČNE METODE (TITRACIJE)

Titracije so uradne farmakopejske metode in jih uporabljamo za kontrolo kakovosti zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi (17). Princip titracijskih metod temelji na reakciji med analitom in volumnom dodanega reagenta z znano koncentracijo. Titracija v splošnem poteka tako, da se k raztopini analita z znanim volumnom postopoma dodaja titrant (tj. reagent z znano koncentracijo), vse dokler ne poteče popolna reakcija med titrantom in analitom. V tem primeru govorimo o tako imenovani direktni titraciji. Poznamo tudi povratno titracijo, pri kateri uporabljamo dva titranta. Pri tem raztopini analita z znanim volumnom najprej dodajamo presežek prvega titranta, nato pa njegov prebitek titriramo z drugim titrantom (17).

Da bi dosegli visoko natančnost pri titraciji, moramo natančno poznati koncentracijo titranta. To določimo pred samim potekom titriranja, pri čemer je treba uporabiti ustrezen primarni standard. Zahteve zanj so, da ima visoko kemijsko čistost (> 99,95 %), ima dobro opredeljeno kemijsko sestavo, ki se ne spremeni tudi ob prisotnosti zraka ali svetlobe, biti mora dobro topen v titracijskem topilu, imeti mora visoko molekulsko maso, poleg tega mora biti močan elektrolit (17).

Titracija je končana, ko je dosežena ekvivalentna točka oz., ko ves analit zreagira s titrantom in se tako pretvori v produkt. Eksperimentalno določimo končno točko titracije z uporabo indikatorja, ki spremeni barvo v bližini ekvivalentne točke. Indikator dodamo v raztopino analita, sprememba barve pa je posledica presežnega titriranja. Prednost barvnih indikatorjev je ugodna cena in enostavna uporaba. Njihovo alternativo predstavlja potenciometrična titracija, ki je avtomatizirana in veliko bolj natančna (17). Potenciometrična metoda namreč temelji na merjenju napetosti galvanskega člana. **Potenciometrična titracija** poteka tako, da ob dodajanju reagenta z znano koncentracijo v raztopino z analitom merimo spremembo v potencialu med referenčno in indikatorsko elektrodo. Končno točko titracije pri tovrstni metodi določamo na osnovi maksimalne spremembe v potencialu, in sicer računsko (s pomočjo prvega in drugega odvoda) ali grafično iz poteka titracijske krivulje. V primerjavi s titracijami, ki vsebujejo indikatorje, potenciometrična titracija daje bolj zanesljive rezultate, zato se ta metoda v industriji vse več uporablja. Običajno jo uporabljamo pri nevtralizacijskih, oksidacijsko redukcijskih in obarjalnih titracijah. (22, 23)

1.5.1 VRSTE TITRACIJ

Glede na vrste interakcij med analitom in titrantom lahko titracije razdelimo v štiri skupine. To so nevtralizacijske, oksidacijsko-redukcijske, kompleksometrične in obarjalne titracije (17, 22).

Pri *nevtralizacijskih metodah* je osnovna reakcija nevtralizacija oz. nastanek vode iz hidroksidnih in vodikovih ionov. Delimo jih na acidometrične in alkalimetrične nevtralizacijske metode.

Oksidacijsko redukcijske metode so osnovane na reakcijah, kjer poteka izmenjava elektronov med reaktanti. Istočasno torej potekata oksidacija in redukcija. Pri tej metodi za titracijo reductentov uporabljamo oksidante (npr. KMnO_4), za titracijo oksidantov pa reducente (npr. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Kompleksometrične metode temeljijo na reakcijah, kjer nastanejo (topni) stabilni kompleksi. Pri tovrstnih titracijah najpogosteje uporabljamo EDTA (tj. etilendiamintetraocetna kislina), saj s kovinskimi ioni tvori stabilne komplekse.

Obarjalne titracije potekajo na osnovi nastanka slabo topnih oborin. Uporabljamo jih za določanje halogenidov, tiocianidnih in cianidnih ionov, ki s srebrovimi ioni (npr. raztopina AgNO_3) tvorijo slabo topne oborine.

1.6 VALIDACIJA ANALITSKIH METOD

V farmacevtski industriji je zelo pomembno, da so analitske metode validirane, saj s tem zagotovimo, skladnost, zanesljivost in točnost podatkov. Z validacijo torej zagotavljamo, da so na trg sproščeni učinkoviti kakovostni in varni farmacevtski izdelki (24).

V farmacevtskem terminološkem slovarju je validacija definirana kot: »dokumentiran postopek dokazovanja, s katerim se v skladu z načeli dobre proizvodne prakse preverja, ali postopek, proces, oprema, snov, dejavnost ali sistem dejansko vodijo do rezultatov, ki ustrezajo vnaprej postavljenim merilom kakovosti« (10). Različni regulatorni organi dajejo poseben poudarek validaciji vseh procesov v industriji. Validacija je formalen in sistematičen način za prikaz primernosti metode – z njo zagotavljamo, da postopek oz. metoda dajeta zadovoljive in točne rezultate v okviru postopka. Različne analitske metode se nanašajo na način izvajanja analize, vsem pa je skupno to, da je cilj validacije dokazati, da je analitska metoda ustrezna za predviden namen uporabe (24).

Validacijo analitskih metod izvajamo v skladu z ICH smernicami (tj. mednarodna konferenca o usklajevanju; *angl. International Conference on Harmonisation*). Pri tem je ključnega pomena ICH smernica Q2 (R1), ki podrobno definira parametre, ki jih je tekom validacije treba preveriti. Kot najpogosteje uporabljene analitske postopke, ki jih je treba validirati, smernica navaja štiri skupine. To so identifikacije, kvantitativno določanje vsebnosti nečistot, limitni testi za kontrolo nečistot in kvantitativno določanje vsebnosti zdravilnih učinkovin (25).

Pred laboratorijsko izvedbo validacije najprej pripravimo validacijski protokol, v katerem natančno predpišemo izvedbo vseh preizkusov. Določimo namen uporabe analizne metode, predpišemo ustrezne validacijske parametre, ki jih je treba analizirati in postavimo minimalne kriterije sprejemljivosti rezultatov. Nato sledi praktična izvedba validacijskih preizkusov v laboratoriju. Po končani izvedbi je treba vse rezultate strokovno pregledati in statistično ovrednotiti, nato pa se na podlagi izvedbe, vseh ugotovitev oz. rezultatov pripravi končno validacijsko poročilo. Pomembno je, da je vsak korak validacije skrbno dokumentiran (24).

1.6.1 VALIDACIJSKI PARAMETRI

V preglednici I so zbrani validacijski parametri, ki jih najpogosteje preverjamo pri posameznih analitskih metodah.

Preglednica I: Parametri, ki so potrebni za validacijo določitve – po ICH. Z ✓ so označeni parametri, ki se običajno preverjajo, z – so označeni parametri, ki se jih običajno ne preverja. (25).

	Identifikacija	Določanje nečistot		Vsebnost
		kvantitativno	Limitno	
Točnost	-	✓	-	✓
Ponovljivost	-	✓	-	✓
Rigidnost	-	✓ (1)	-	✓ (1)
Specifičnost/ Selektivnost	✓ (2)	✓ (2)	✓ (2)	✓ (2)
Meja zaznavnosti	-	- (3)	✓	-
Meja vrednotenja	-	✓	-	-
Linearnost	-	✓	-	✓
Območje	-	✓	-	✓

(1) Rigidnost ni potrebna, kadar je določena obnovljivost.

(2) Pomanjkanje specifičnosti lahko preverimo z drugim analitskim postopkom.

(3) Ta parameter je včasih lahko potreben, odvisno od konkretnega postopka.

Ker bomo v eksperimentalnem delu izvedli validacijo metod za določanje vsebnosti, se bomo v nadaljevanju osredotočili na sledeče validacijske parametre: točnost, natančnost, specifičnost/selektivnost, linearnost in območje analitske metode. Predstavili bomo tudi robustnost metode (24, 25).

Točnost analitske metode izraža ujemanje dobljene vrednosti (to pridobimo z meritvami) s pravo vrednostjo. Običajno jo izražamo kot izkoristek (v odstotkih), prav tako pa jo lahko navajamo tudi kot razliko med določeno in sprejeto vrednostjo, podano skupaj z intervalom zaupanja. Točnost analitske metode mora biti zagotovljena skozi celotno območje analize metode.

Natančnost analitske metode predstavlja stopnjo ujemanja (stopnjo razpršenosti) rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Običajno jo izrazimo kot relativno standardno deviacijo (koeficient variance), standardno deviacijo in interval zaupanja serije meritev.

Glede na ICH smernice natančnost metode preverjamo v treh nivojih:

- *Natančnost znotraj metode/ponovljivost*: izraža stopnjo ujemanja pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem obdobju (znotraj enega dne) z istim analitikom, isto opremo ter reagenti.
- *Vmesna natančnost/rigidnost*: izraža variacije znotraj istega laboratorija, vendar se analize izvajajo v istem laboratoriju pri različnih dnevih, analitikih ali različni opremi.
- *Obnovljivost*: izraža natančnost metode med laboratoriji. Običajno se izvaja zelo redko, npr. ob prenosu metode iz razvojnega laboratorija v laboratorij, ki bo rutinsko izvajal analize.

Specifičnost analitske metode je po ICH smernicah definirana kot zmožnost metode, da nedvomno analizira analit ob prisotnosti komponent, za katere lahko predvidevamo, da so prisotne v vzorcu (matriks, razpadni produkti, nečistote ...). Tudi **selektivnost metode** se nanaša na zmožnost določevanja analizirane snovi v prisotnosti drugih komponent matriksa vzorca. Oba izraza sta podobna, zato ju pogosto zamenjujemo. Razlika je v tem, da s selektivno metodo lahko določimo več komponent hkrati (pod pogojem, da se komponente razlikujejo med seboj), medtem ko se specifičnost metode nanaša na

določevanje le enega analita. Primer selektivne metode je kromatografija, specifična metoda pa je titracija.

Linearnost je definirana kot sposobnost analitske metode, da daje rezultate, ki so neposredno ali z definiranimi matematičnimi pretvorbami sorazmerni količini analita v vzorcu. Linearnost določamo skozi celotno območje analitske metode, cilj tega parametra pa je prikazati model (tj. regresijska premica), ki čimbolje opisuje razmerje med koncentracijo (oz. količino) analita in odzivom.

Območje analitske metode predstavlja interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo (količino) analita v vzorcu, za katerega so bile že dokazane ustrezna točnost, natančnost in linearnost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti.

Robustnost analitske metode v preglednici I sicer ni navedena, vendar je to prav tako pomemben validacijski parameter. Definirana je kot sposobnost metode, da ostane neprizadeta zaradi majhnih, namernih in nenamernih razlik v parametrih metode. Robustnost predstavlja merilo zanesljivosti analitske metode med normalno uporabo in jo običajno določimo že med samim razvojem analitske metode (torej pred izvedbo validacije), zato v preglednici I tudi ni navedena. Tukaj uvrščamo tudi stabilnost raztopin vzorcev in standardov.

2 NAMEN DELA

Cilj magistrske naloge je primerjava že obstoječih farmakopejskih metod za določanje vsebnosti dveh analitov iz skupine B-vitaminov. To sta vitamina tiaminijev klorid (B1) in piridoksinijev klorid (B6). Primerjali bomo titracijo (tj. metoda za določanje vsebnosti obeh analitov po evropski farmakopeji) s HPLC metodo (tj. metoda za določanje vsebnosti obeh analitov po ameriški farmakopeji). Naš namen je ugotoviti, katera od omenjenih metod je za določanje vsebnosti izbranih analitov boljša oz. bolj primerna tako z ekonomskega kot tudi s kakovostnega vidika oz. natančnosti. Raziskovalno delo bomo izvedli v sodelovanju s podjetjem Lek, zato se bomo osredotočili predvsem na uporabnost in primernost metod z industrijskega vidika.

V prvi fazi bomo pregledali farmakopejske metode (po evropski in ameriški farmakopeji) za določanje vsebnosti obeh vitaminov, nato bomo le te tudi eksperimentalno izvedli. Izvedli bomo validacijo posameznih metod. Pri tem bomo analizirali validacijske parametre: natančnost znotraj enega dneva, linearnost, točnost, robustnost in selektivnost/specifičnost metode.

S pomočjo vseh zbranih podatkov in rezultatov bomo tako lahko ugotovili prednosti in slabosti posameznih analitskih metod, obenem bomo poskušali določiti najboljšo analitsko metodo za določanje vsebnosti posameznega analita. Izbrano analitsko metodo bi potem lahko v prihodnosti uporabili v industriji in s tem nadomestili morebitne analitske metode, ki se v industrijski praksi uporabljajo sicer, vendar so stroškovno manj ugodne (npr. titracija namesto HPLC).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Analiti:

- Tiaminijev klorid, $M = 337,3 \text{ g/mol}$
- Piridoksinijev klorid, $M = 205,6 \text{ g/mol}$

Materiali in oprema za titracije:

- 0,1 M HClO_4 v brezvodni očetni kislini; Merck, Nemčija
- Brezvodna metanojska kislina, 98 % – 100 %; Merck, Nemčija
- Acetanhidrid, $\geq 99 \%$; Merck, Nemčija
- Pufri za kalibracijo elektrode: 4,01; 7,00; 9,1; Mettler Toledo, ZDA
- Titrator: Mettler Toledo V30 s kombinirano stekleno pH elektrodo (DG-116 Solvent) za nevodne titracije in 20 mL bireto; Mettler Toledo
- Programska oprema: Lab X 2016; Mettler Toledo
- Avtomatska pipeta 100 – 5000 μL ; Picus
- Analitska tehtnica XP205; Mettler Toledo
- Termometer
- Pribor: stekleni tehtalni čolnički, titracijski lončki (100 mL, plastični), spatula, merilni valj (50 mL)
- Programska oprema za statistično obdelavo podatkov: Excel 2010

Materiali in oprema za HPLC metode:

- Brezvodna očetna kislina, 100 %; Merck, Nemčija
- Natrijev 1-heksansulfonat, $\geq 99,0 \%$; Merck, Nemčija
- Dodatno prečiščena voda (DPV); MilliQ voda (upornost 18,2 $\text{M}\Omega$); Lek
- 1 M NaOH Titrisol; Merck, Nemčija
- Metanol, (MeOH 8402) HPLC gradient grade; J. T. Baker, Norveška
- Acetonitril, (ACN 8143) HPLC gradient grade; J. T. Baker, Norveška
- Natrijev 1-oktansulfonat monohidrat, $\geq 97,0 \%$; Sigma Aldrich, Nemčija
- Standardi:
 - o Tiaminijev klorid, delovni standard, (99,6 % vsebnost na brezvodno snov); Sigma Aldrich, Nemčija

- Piridoksinijev klorid, delovni standard (99,98 % vsebnost na snov kot je); Sigma Aldrich, Nemčija
- 4-hidroksibenzojska kislina, ≥ 99 %; Sigma Aldrich, Nemčija
- Metil benzoat, 99,8 %; Merck, Nemčija
- HPLC instrument (Waters 2695) z avtomatskim vzorčevalnikom, razplinjevalcem, binarno črpalko, kolonskim termostatom in PDA detektorjem (tj. detektor z nizom fotodiod)
- Kolona: Altima C18 5 μm 250 \times 4,6 mm
- Programska oprema: Empower; Waters
- Avtomatska pipeta: Handy Step; Brand
- Ultrazvočna kopel: Branson 8510
- Analitska tehtnica: Mettler Toledo, XP205
- pH meter: Mettler Toledo; Seven multi
- Hladilnik
- Programska oprema za statistično obdelavo podatkov: Excel 2010

3.2 METODE

3.2.1 DOLOČANJE VSEBNOSTI ANALITOV S TITRACIJAMI

3.2.1.1 Priprava sistema

Najprej smo pripravili celoten titracijski sistem, tako da smo na inštrument (titrator) namestili elektrodo, ustrezno titrno raztopino (tj. reagent z znano koncentracijo) in 20 mL bireto. Kot titrno raztopino smo po farmakopejskih predpisih pri obeh analitih uporabili 0,1 M HClO_4 . V ta namen smo uporabili že pripravljen komercialno dostopen reagent podjetja Merck, ki že ima določen korekcijski faktor, zato standardizacije tega reagenta nismo izvajali. Korekcijski faktor raztopine smo prevzeli po certifikatu proizvajalca (1,000 pri 20 °C), pri tem pa smo upoštevali, da je faktor 0,1 M HClO_4 odvisen od temperature in se spreminja po enačbi $1,000 - ((T - 20 \text{ °C}) \times 0,0011)$. Med izvajanjem titracij smo zato vseskozi spremljali temperaturo in to upoštevali pri izračunu faktorja.

Po namestitvi titrne raztopine smo celoten sistem (bireto, cevke) najprej dobro sprali s titrno raztopino. S tem smo odstranili morebitne mehurčke zraka v cevkah, ki bi sicer lahko vplivali na rezultat. Sledila je kalibracija elektrode. Ker smo v obeh primerih izvajali brezvodno titracijo, smo v ta namen uporabili kombinirano stekleno pH elektrodo

DG116-Solvent (Mettler Toledo) za nevodne titracije. Kalibracijo elektrode smo izvedli po metodi proizvajalca (Mettler Toledo), in sicer najprej s preverjanjem naklona v certificiranih pufrih 4,01, 7,00 ter 9,21 in spremljanjem nihanja električne napetosti znotraj intervala 60 s v pufru 7,00. Po ustrezni kalibraciji elektrode smo začeli z izvajanjem analize. Najprej smo pripravili in titrirali slepo raztopino, nato pa še vzorce. Oba vitamina smo analizirali po evropski farmakopejski metodi za vsebnost (PhEur), pri tem pa smo upoštevali predpisano mejo ustreznosti po PhEur monografiji (26).

Kriterij za vsebnost piridoksinijevega klorida: 99,0 % – 101,0 % na suho snov

Kriterij za vsebnost tiaminijevega klorida: 98,5 % – 101,0 % na brezvodno snov

3.2.1.2 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida (26)

150 mg vzorca (tj. vitamin piridoksinijev klorid) smo raztopili v 5 mL brezvodne metanojske kisline in dodali 50 mL acetanhidrida. Raztopino smo nato potenciometrično titrirali z 0,1 M HClO₄, pri čemer smo titracijske parametre nastavili tako, da se je raztopina vzorca vseskozi mešala in da je bila titracija zaključena takoj, ko je bila dosežena ekvivalentna točka. Po enakem postopku kot raztopino vzorca, smo pripravili ter titrirali tudi slepo raztopino, le da pri njej vitamina nismo dodali. Pri izračunu vsebnosti smo upoštevali, da 1 mL 0,1 M HClO₄ ustreza 20,56 mg C₈H₁₂ClNO₃.

V program Lab X smo pred začetkom titriranja natančno vnesli vse zatehte (mase) vzorca in molekulsko maso vzorca ter koncentracijo in korekcijski faktor titrne raztopine. Na podlagi vnešenih podatkov je program po končani titraciji samodejno izračunal vsebnost piridoksinijevega klorida v vzorcu po spodnji enačbi (*enačba 7*).

$$R1 = \frac{(Q - B) \times c \times f \times M}{m} \times 100$$

Enačba 7: Izračun vsebnosti piridoksinijevega klorida (titracija).

R1... vsebnost piridoksinijevega klorida na snov, kot je [%]

Q... volumen porabljene titrne raztopine za doseg ekvivalentne točke za raztopino vzorca [mL]

B... volumen porabljene titrne raztopine za doseg ekvivalentne točke za slepi vzorec [mL]

c ... koncentracija titrne raztopine [0,1 mol/L]

f... korekcijski faktor titrne raztopine

M... molekulska masa vzorca, za piridoksinijev klorid = 205,6 g/mol

m... masa vzorca [mg]

3.2.1.3 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida (26)

110 mg vzorca (tj. vitamin tiaminijev klorid) smo raztopili v 5 mL brezvodne metanojske kisline in dodali 50 mL acetanhidrida. Raztopino smo nato potenciometrično titriral z 0,1 M HClO₄, pri čemer smo titracijske parametre nastavili tako, da se je titracija zaključila znotraj 2 minut. Po enakem postopku kot raztopino vzorca smo pripravili ter titriral tudi slepo raztopino, le da pri njej vitamina nismo dodali. Pri izračunu vsebnosti smo upoštevali, da 1 mL 0,1 HClO₄ ustreza 16,86 mg C₁₂H₁₈Cl₂N₄OS.

V program Lab X smo pred začetkom titriranja natančno vnesli vse zatehte (mase) vzorca in molekulsko maso vzorca ter koncentracijo in korekcijski faktor titrne raztopine. Na podlagi vnešenih podatkov je program po končani titraciji samodejno izračunal vsebnost tiaminijevega klorida v vzorcu po spodnji enačbi (*enačba 8*).

$$R1 = \frac{(Q - B) \times c \times f \times M}{2 \times m} \times 100$$

Enačba 8: Izračun vsebnosti tiaminijevega klorida (titracija).

R1... vsebnost tiaminijevega klorida na snov, kot je [%]

Q... volumen porabljene titrne raztopine za doseg ekvivalentne točke za raztopino vzorca [mL]

B... volumen porabljene titrne raztopine za doseg ekvivalentne točke za slepi vzorec [mL]

c ... koncentracija titrne raztopine [0,1 mol/L]

f... korekcijski faktor titrne raztopine

M... molekulska masa vzorca, za tiaminijev klorid = 337,3 g/mol

m... masa vzorca [mg]

3.2.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI ANALITOV Z METODAMI HPLC

Tiaminijev klorid in piridoksinijev klorid smo analizirali tudi po ameriški farmakopejski metodi za vsebnost (USP), kjer je predpisana HPLC metoda z internim standardom za določevanje vsebnosti obeh analitov (27). Pri obeh analitih smo po ustrezni pripravi sistema najprej injicirali topilo, nato $6 \times$ raztopino delovnega standarda 1 (za potrebe določanja ustreznosti kromatografskega sistema; glej preglednici II in III) in $1 \times$ raztopino delovnega standarda 2, iz katerega smo izračunali ujemanje obeh standardov. Ko smo ugotovili, da vsi parametri za določanje ustreznosti kromatografskega sistema ustrezajo našim predpisom, je sledilo injiciranje raztopin vzorcev. Na koncu sekvence smo še enkrat injicirali topilo in raztopino standarda 1. Priprava vzorcev je podrobneje opisana v poglavju 3.2.2.1 in 3.2.2.2.

Preglednica II: Zahtevani parametri za določanje ustreznosti kromatografskega sistema pri določanju vsebnosti piridoksinijevega klorida (po USP); IS pomeni interni standard(27).

R (ločljivost) $\geq 2,5$ med vrhom piridoksinijevega klorida in p-hidroksibenzojsko kislino (IS) RSD $\leq 3,0$ % glede na razmerje med površino vrha piridoksinijevega klorida in površino vrha IS

Kriterij za vsebnost piridoksinijevega klorida: 98,0 % – 102,0 % na suho snov.

Preglednica III: Zahtevani parametri za določanje ustreznosti kromatografskega sistema pri določanju vsebnosti tiaminijevega klorida (po USP); IS pomeni interni standard (27).

R $\geq 4,0$ med vrhom tiaminijevega klorida in metilbenzoata (IS) As (faktor simetrije) $\leq 2,0$ za vrh tiaminijevega klorida N (število teoretskih podov) ≥ 1500 za vrh tiaminijevega klorida RSD $\leq 2,0$ % glede na razmerje med površino vrha tiaminijevega klorida in površino vrha IS
--

Kriterij za vsebnost tiaminijevega klorida: 98,0 % – 102,0 % na brezvodno snov.

3.2.2.1 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida (27)

Preglednica IV: Kromatografski pogoji za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida s HPLC.

Kromatografski pogoji	
Detektor	UV-VIS, 280 nm
Kolona	4,6 mm × 25 cm, C18, Altima
Pretok mobilne faze	1,5 mL/min
Volumen injiciranja	20 µL

Kromatografski pogoji za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida so prikazani v preglednici IV. Temperatura kolone in vzorčevalnika v farmakopeji nista predpisana, zato smo meritve izvajali pri sobni temperaturi (temperaturo kolone smo nastavili na 25 °C, temperaturo vzorčevalnika pa na 22 °C). Čas analize smo nastavili na 12 min, in sicer tako, da sta relativna retencijska časa za piridoksinijev klorid in *p*-hidroksibenzojsko kislino (tj. interni standard) znašala približno 0,7 in 1,0.

Priprava raztopin:

Mobilno fazo (MF) smo pripravili tako, da smo v 1000 mL merilni bučki zmešali 0,6 g natrijevega 1-heksansulfonata z 10 mL brezvodne očetne kisline in 700 mL vode (DPV). Sledilo je uravnavanje pH na 3,0, pri tem smo uporabili 1 M NaOH. Na koncu smo dodali še 235 mL metanola in redčili z vodo do oznake. Pripravljena mobilna faza nam je v nadaljevanju služila tudi kot topilo pri pripravi raztopin standardov in vzorcev. Ker je validacijska študija potekala več dni, smo zaradi velike porabe MF, le to pripravili večkrat oz. v večjih količinah.

Raztopino internega standarda smo pripravili tako, da smo v 100 mL merilno bučko zatehtali 500 mg 4-hidroksibenzojske kisline, jo raztopili v MF in dopolnili z MF do oznake ($c = 5 \text{ mg/mL}$). To raztopino smo uporabljali skozi celotno validacijsko študijo, zato smo jo shranjevali v hladilniku.

Priprava raztopin standarda piridoksinijevega klorida in vzorcev:

Raztopine standardov in vzorcev smo pripravili tako, da smo najprej v 50 mL merilno bučko zatehtali 25 mg standarda* oz. vzorca (tj. vitamin piridoksinijev klorid) in dopolnili do oznake z mobilno fazo. Nato smo v 100 mL merilno bučko natančno odpipetirali 10,0

mL te pripravljene raztopine in dodali 1,0 mL raztopine internega standarda. Preostanek, do oznake bučke 100 mL, dopolnili z MF.

*Kot standard smo uporabili delovni standard piridoksinijev klorid (proizvajalec Sigma Aldrich) z deklarirano vsebnostjo (P_{st1}) 99,98 % na snov, kot je.

Rezultate vsebnosti smo izračunali po spodnji *enačbi 9*.

$$R = (r_{vz}/r_{st}) \times (C_{st}/C_{vz}) \times 100$$

Enačba 9: Izračun vsebnosti piridoksinijevega klorida (po USP).

R... vsebnost piridoksinijevega klorida na snov, kot je [%]

r_{vz} ... razmerje med površino vrha (A_{analit}) iskanega analita (piridoksinijev klorid) in površino vrha IS (A_{IS}) v *raztopini vzorca* (A_{analit}/A_{IS})

r_{st} ... razmerje med površino vrha (A_{analit}) iskanega analita (piridoksinijev klorid) in površino vrha IS (A_{IS}) v *raztopini standarda* (A_{analit}/A_{IS})

C_{st} ... koncentracija standardne raztopine [mg/mL];

(masa standarda/ faktor redčenja $\times P_{st1}/100$); $P_{st1} = 99,98 \%$

C_{vz} ... koncentracija raztopine vzorca [mg/mL];

(masa vzorca/ faktor redčenja)

3.2.2.2 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida (27)

Preglednica V: Kromatografski pogoji za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida s HPLC.

Kromatografski pogoji	
Detektor	UV 254 nm
Kolona	4,6 mm \times 25 cm, C18, Altima
Pretok mobilne faze	1,5 mL/min
Volumen injiciranja	10 μ L

Kromatografski pogoji za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida so prikazani v preglednici V. Temperatura kolone in vzorčevalnika v farmakopeji nista predpisana, zato smo meritve izvajali pri sobni temperaturi (pri temperaturi kolone 25 °C in temperaturi

vzorčevalnika 22 °C). Kolono smo uporabili nekoliko drugačnih dimenzij, kot jo predpisuje farmakopeja (USP zahteva 4 mm × 30 cm, C18), vendar le ta še vedno ustreza dovoljenim odstopanjem (razmerje med dolžino kolone in velikostjo stacionarne faze mora biti po spremembi v območju – 25 % do + 50 %; pri nas je bilo približno 15 %) oz. je ustrezna. Pretok MF je v farmakopeji sicer naveden 1,0 mL/min, vendar je v monografiji navedeno, da ga je treba prilagoditi tako, da retencijski čas tiaminijevega klorida znaša približno 12 min, zato smo ga nastavili na 1,5 mL/min. Čas analize smo nastavili na 25 minut.

Priprava raztopin:

Mobilno fazo smo pripravili tako, da smo zmešali *raztopino B* in *raztopino A* v razmerju 40: 60 (V/V). Skupno smo pripravili 5 L MF, tako da smo zmešali 2 L raztopine B s 3 L raztopine A. Pripravljena mobilna faza nam je v nadaljevanju služila tudi kot topilo pri pripravi raztopin standardov in vzorcev. Ker je validacijska študija potekala več dni, smo zaradi velike porabe MF, le to pripravili večkrat oz. v večjih količinah.

Raztopina A je 0,005 M natrijev 1-oktansulfonat v redčeni očetni kislini (1 v 100; V/V). Pripravili smo jo tako, da smo v 5 L merilno bučo, zatehtali 5,85 g natrijevega-1-oktansulfonata monohidrata in dopolnili do oznake z redčeno očetno kislino 1 v 100 (priprava: 50 mL brezvodne očetne kisline smo odpipetirali v 5 L merilno bučo in redčili z vodo do oznake).

Raztopino B smo pripravili tako, da smo zmešali metanol in acetonitril v volumskem razmerju 3:2 (oz. 2400 mL metanola in 1600 mL acetonitrila).

Raztopino internega standarda smo pripravili tako, da smo v 250 mL bučko odpipetirali 5,0 mL metilbenzoata in redčili z metanolom do oznake. To raztopino smo uporabljali skozi celotno validacijsko študijo, zato smo jo shranjevali v hladilniku.

Priprava raztopin standarda tiaminijevega klorida in vzorcev:

Raztopine standardov smo pripravili tako, da smo najprej v 50 mL merilno bučko zatehtali 50 mg standarda* tiaminijevega klorida in dopolnili do oznake z mobilno fazo (c = 1 mg/mL). Nato smo v 50 mL merilno bučko natančno odpipetirali 20,0 mL te pripravljene raztopine in dodali 5,0 mL raztopine internega standarda. Preostanek, do oznake bučke 50 mL, smo dopolnili z MF (c = 400 µg/mL).

*Kot standard smo uporabili delovni standard tiaminijev klorid (proizvajalec Sigma Aldrich) z deklarirano vsebnostjo (P_{st2}) 99,6 % na brezvodno snov. Pri izračunu smo upoštevali tudi vsebnost vode v standardu, in sicer je to 3,8 % (navedeno v certifikatu standarda).

Raztopine vzorcev smo pripravili tako, da smo najprej v 20 mL merilno bučko zatehtali 40 mg vzorca, vitamina tiaminijevega klorida in dopolnili do oznake z mobilno fazo ($c = 2$ mg/mL). Nato smo v 50 mL merilno bučko natančno odpipetirali 10,0 mL te pripravljene raztopine in dodali 5,0 mL raztopine internega standarda. Preostanek do oznake bučke 50 mL smo dopolnili z MF.

Rezultate vsebnosti smo izračunali po *enačbi 10*.

$$R = (r_{vz}/r_{st}) \times (C_{st}/C_{vz}) \times 100$$

Enačba 10: Izračun vsebnosti tiaminijevega klorida (USP).

R... vsebnost tiaminijevega klorida na snov, kot je [%]

r_{vz} ... razmerje med površino (A_{analit}) vrha iskanega analita (tiaminijev klorid) in površino vrha IS (A_{IS}) v *raztopini vzorca* (A_{analit}/A_{IS})

r_{st} ... razmerje med površino (A_{analit}) vrha iskanega analita (tiaminijev klorid) in površino vrha IS (A_{IS}) v *raztopini standarda* (A_{analit}/A_{IS})

C_{st} ... koncentracija standardne raztopine (mg/ mL);

(masa standarda/ faktor redčenja) \times ((100 – delež vode v st.) /100) \times ($P_{st2}/100$);

$P_{st2} = 99,6$ %; delež vode v st. = 3,8 %

C_{vz} ... koncentracija raztopine vzorca [mg/mL];

(masa vzorca/ faktor redčenja)

3.2.3 VALIDACIJA TITRACIJSKIH METOD ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI

Obe farmakopejski metodi po PhEur smo validirali, da bi s tem potrdili natančnost, točnost, linearnost, stabilnost raztopin in selektivnost oz. specifičnost metode. Glede na to, da smo uporabili farmakopejski analitski postopek, nam celotne validacijske študije ne bi bilo treba izvesti. Analizirali smo le nekatere validacijske parametre, kot so natančnost

metode znotraj enega dneva, točnost in linearnost metode, robustnost (stabilnost raztopin vzorcev) in specifičnost metode.

Celotno validacijo smo izvedli na vitaminih piridoksinijev klorid in tiaminijev klorid, ob upoštevanju kriterijev za vsebnost, ki so navedeni v preglednici VI. Vse vrednosti so morale ustrezati specifikacijski meji, ki glede na farmakopejski predpis za piridoksinijev klorid znaša 99,0 % – 101,0 % na suho snov oz. za tiaminijev klorid 98,5 % – 101,0 % na brezvodno snov.

Z validacijo metode smo najprej začeli tako, da smo pripravili validacijski protokol, v katerem smo natančno opisali celotno izvedbo (opis metode, seznam validacijskih parametrov), vključno s kriteriji sprejemljivosti. Nato smo začeli z izvajanjem analize. V nadaljevanju je opisana priprava raztopin za testiranje posameznih validacijskih parametrov pri obeh metodah. Vse rezultate smo podajali na snov, kot je, v odstotkih, nato pa smo jih preračunali tako, kot zahteva farmakopeja. Rezultate smo statistično obdelali v programu Excel.

Preglednica VI: Vrednoteni parametri in kriteriji, ki smo jih upoštevali pri validaciji obeh titracijskih metod.

PARAMETER	KRITERIJ
Natančnost metode znotraj enega dneva (ponovljivost)	RSD ($n \geq 6$) ≤ 1 % za specifikacijsko mejo 98 – 102 % RSD ($n \geq 6$) $\leq 0,5$ % za specifikacijsko mejo 99 – 101 % Interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti: <i>za $n = 6$: $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$; $t_{tab}(0,01, n-1) = 4,032^*$</i>
Točnost metode	Povprečni izkoristek: 98,0 – 102,0 % Posamezni izkoristek: 97,0 – 103,0 % Interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti za povprečni izkoristek: ($n = 3$): $t_{tab}(0,05, n-1) = 4,303$ RSD za izkoristek ($n \geq 9$) $\leq 2,0$ %
Linearnost metode	Prikaz linearne krivulje: naklon premice, presečišče na y-osi, vsota ostankov kvadratov. $r \geq 0,998$ ± 5 % odstop odseka na osi y glede na specifikacijsko mejo za območje: 80 – 120 %

Robustnost metode: stabilnost raztopin vzorcev	Relativna sprememba vsebnosti glede na t = 0 h: $\Delta \leq 0,5 \%$
Specifičnost metode	Nobene interference.
* vsi rezultati morajo biti znotraj intervala zaupanja pri 95 % ($t_{\text{tab}}(0,05)$) zanesljivosti.	

3.2.3.1 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida in tiaminijevega klorida

- Natančnost metode znotraj enega dneva (ponovljivost) in specifičnost metode

Raztopine vzorcev smo pripravili, tako kot je to opisano v poglavju 3.2.1.2. oz. 3.2.1.3. Pripravili smo 6 paralelk raztopin vzorca, nato pa ob upoštevanju vseh ponovitev izračunali povprečno vsebnost piridoksinijevega klorida oz. tiaminijevega klorida v posameznem vzorcu. Izračunali smo tudi RSD ($n = 6$) povprečnih vsebnosti in interval zaupanja meritev vsebnosti pri 95 % ($n = 6$; $t_{\text{tab}} = 2,571$) zanesljivosti. Titracijsko krivuljo 1. paralelke in slepe raztopine smo uporabili tudi za specifičnost metode.

- Linearnost metode in točnost metode

Določanje linearnosti in točnosti metode smo izvedli istočasno. Analizo smo izvedli v 5 različnih koncentracijah vzorca (50 % – 150 % glede na predpisano koncentracijo v farmakopeji) in sicer v treh paralelkah.

Raztopine vzorcev smo pripravili, tako kot je to opisano v poglavju 3.2.1.2. oz. 3.2.1.3., drugačne so le mase vzorca, saj smo analizo izvajali pri različnih koncentracijah raztopin vzorca. V preglednici VII so navedene okvire zatehte posameznega vzorca. Vsako koncentracijo (maso) smo pripravili v 3 paralelkah. Podatke pri 80 %, 100 %, 120 % koncentraciji vzorca smo uporabili tudi za določanje točnosti metode.

Preglednica VII: Zatehte posameznega vzorca pri različnih koncentracijah.

Koncentracija vzorca* [%]	Masa piridoksinijevega klorida [mg]	Masa tiaminijevega klorida [mg]
50	75	55
80	120	88
100	150	110
120	180	132
150	225	165

* Glede na predpisano koncentracijo vzorca v farmakopeji ($c = 2,73$ mg/mL za piridoksinijev klorid in $2,00$ mg/mL za tiaminijev klorid).

Iz rezultatov analize oz. odčitane volumna porabljene titrne raztopine za doseg ekvivalentne točke smo za posamezno meritev izračunali izmerjeno množino titrne raztopine (enačba 11):

$$\text{Izmerjena množina (mmol)} = (C(\text{HClO}_4) \times V(\text{HClO}_4) \times \text{faktor}) - n \text{ slepa}$$

Enačba 11: Izračun izmerjene množine porabljene titrne raztopine.

$C(\text{HClO}_4)$ Koncentracija titrne raztopine $0,1$ M HClO_4 ($0,1$ M)

$V(\text{HClO}_4)$... volumen porabljene raztopine za doseg ekvivalentne točke [mL]

faktor... korekcijski faktor titrne raztopine (odvisen je od T; $1,000$ pri 20 °C)

n slepa ... množina porabljene titrne raztopine pri titraciji slepega vzorca [mmol]

S pomočjo zatehte in vsebnosti vzorca (vzamemo povprečje rezultatov za natančnost metode; $n = 6$) smo izračunali dodano množino titrne raztopine po enačbi 12:

$$\text{Dodana množina [mmol]} = (m \text{ vz} \times \text{vsebnost vz}) / (M \times z)$$

Enačba 12: Izračun dodane množine porabljene titrne raztopine.

m vz... zatehta vzorca [mg]

vsebnost vz... vsebnost vzorca;

(vzamemo povprečen rezultat iz natančnosti metode), [%]

z ... ekvivalenčno število [1 za piridoksinijev klorid; 2 za tiaminijev klorid]

M... molekulska masa vzorca [g/mol] (205,6 g/mol za piridoksinijev klorid; 337,3 g/mol za tiaminijev klorid)

Iz izmerjene in dodane množine smo izračunali izkoristek po *enačbi 13*:

$$\text{Izkoristek [\%]} = (\text{izmerjena množina/dodana množina}) \times 100$$

Enačba 13: Izračun izkoristka [%].

Iz *enačbe 13* smo torej **za točnost** izračunali izkoristke pri 80 %, 100 % in 120 % predpisane koncentracije vzorca. Izračunali smo tudi SD in RSD znotraj območij posameznih koncentracij.

Za ugotavljanje **linearnosti** metode smo iz vseh podatkov volumnov porabljene titrne raztopine (pri različnih koncentracijah vzorcev) v odvisnosti od dodane množine titrne raztopine (pri različnih koncentracijah vzorcev) za vsako paralelko izračunali regresijsko premico v intervalu od 50 % do 150 % ciljne koncentracije analita. Pri tem smo uporabili metodo najmanjših kvadratov. Za vsako paralelko smo dobili enačbo premice, iz katere smo odčitali presečišče z y osjo.

Odstotek presečišča z y osjo smo izračunali za vsako premico posebej in sicer kot količnik med presečiščem z y osjo in povprečnim volumnom ($n = 6$) porabljene titrne raztopine pri natančnosti metode $\times 100$ (*enačba 14*).

$$\begin{aligned} & \% \text{ presečišča} \\ = & \frac{\text{presečišče z y osjo} \times 100}{\text{povprečen volumen porabe titrne razt. pri natančnosti metode (n = 6)}} \end{aligned}$$

Enačba 14: Izračun odstotka presečišča.

- **Robustnost metode: stabilnost raztopin vzorcev**

Raztopine vzorcev za določanje robustnosti metode smo pripravili tako, kot je to zapisano v poglavju 3.2.1.2. oz. 3.2.1.3. Pripravili smo 9 paralelk raztopin vzorca in slepo raztopino, pri čemer smo slepo in paralelko vzorca št. 1 titrirali takoj po pripravi, ostalih 8 paralelk pa smo postavili na ustrezne pogoje (svetloba, tema) in jih titrirali po pretečenem času (1 h, 2 h, 3 h, 30 min). Pogoji shranjevanja raztopin vzorcev št. 1 – 9 so navedeni v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Pogoji shranjevanja raztopin vzorcev tiaminijevega klorida in piridoksinijevega klorida.

Paralelka	Pogoji shranjevanja
Št. 1	Titirana takoj po pripravi, 0 h
Št. 2	Sobna temperatura, svetloba, 1 h
Št. 3	Sobna temperatura, tema, 1 h
Št. 4	Sobna temperatura, svetloba, 2 h
Št. 5	Sobna temperatura, tema, 2 h
Št. 6	Sobna temperatura, svetloba, 3 h
Št. 7	Sobna temperatura, tema, 3 h
Št. 8	Sobna temperatura, svetloba, 30 min
Št. 9	Sobna temperatura, tema, 30 min

Rezultate vsebnosti staranih vzorcev pri navedenih pogojih smo nato primerjali z rezultatom vsebnosti pri času 0 h (paralelka št. 1). Za vsako paralelko smo izračunali spremembo vsebnosti glede na čas 0 h. S tem smo namreč želeli dokazati, kako hitro je potrebno pripraviti in analizirati raztopine vzorcev.

3.2.4 VALIDACIJA HPLC METOD ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI

3.2.4.1 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida in tiaminijevega klorida

Kromatografski pogoji in priprava raztopin so zapisani v poglavju 3.2.2. Nekaj razlik je le v pripravi raztopin vzorcev, ki je podrobneje opisana v nadaljevanju. Tudi tukaj smo pri obeh analitih uporabili farmakopejski metodi, in sicer ameriško farmakopejo (USP) – metoda z internim standardom (27). Preverili smo validacijske parametre: natančnost metode znotraj enega dneva, linearnost in točnost metode, robustnost metode (oz. stabilnost raztopin vzorcev in standardov) in selektivnost metode. Validacijo smo izvedli na vitaminih, deloma pa tudi na standardih (linearnost, točnost) piridoksinijev klorid in tiaminijev klorid, pri čemer smo upoštevali validacijske kriterije, ki so navedeni v preglednici IX.

Vse vrednosti so morale ustrezati specifikacijski meji, ki glede na farmakopejski predpis (po USP) za piridoksinijev klorid znaša 98,0 % – 102,0 % na suho snov oz. za tiaminijev klorid 98,0 % – 102,0 % na brezvodno snov. Ustrezni so morali biti tudi vsi parametri za določitev ustreznosti kromatografskega sistema, ki so navedeni v preglednicah II in III.

Preglednica IX: Vrednoteni parametri in kriteriji, ki smo jih upoštevali pri validaciji obeh HPLC metod.

PARAMETER	KRITERIJI
Ustreznost kromatografskega sistema	Glej preglednico II in III.
Natančnost metode znotraj enega dneva (ponovljivost)	RSD ($n \geq 6$) $\leq 1,0$ % za interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti: $n = 6$: $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$; *
Točnost metode	Posamezni izkoristek: $\leq 100,0 \pm 2,0$ % Celokupni izkoristek: $\leq 100,0 \pm 1,0$ % RSD ($n \geq 3, 9$): $\leq 2,0$ % Interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti za povprečni izkoristek: $t_{tab}(0,05, n-1) = 4,303$
Linearnost metode	Prikaz linearne krivulje: naklon premice, presečišče na y-osi, vsota ostankov kvadratov. $r \geq 0,998$ ± 5 % odstop odseka na osi y glede na odziv pri 100 % konc. standarda - za območje 80 – 120 %
Robustnost metode: stabilnost raztopin vzorcev	RSD ($n \geq 3, 6$) $\leq 1,0$ % Relativna sprememba povprečne vsebnosti glede na $t = 0$ h $\leq \pm 1,0$ % Interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti: $t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571$; *
Robustnost metode: stabilnost raztopin standardov	Posamezna in povprečna (celokupna) sprememba površine glede na $t = 0$ h $\leq \pm 1,0$ %
Selektivnost metode	Na mestu preiskovane substance ne sme biti nobenega odziva topila, mobilne faze, morebitnih nečistot oz. mora biti manjši kot 0,5 % površina standarda.
* vsi rezultati morajo biti znotraj interval zaupanja meritev pri 95 % ($t_{tab}(0,05)$) zanesljivosti.	

- **Natančnost metode znotraj enega dneva (ponovljivost) in selektivnost metode**

Priprava vzorcev in standardov je opisana v poglavju 3.2.2.1. in 3.2.2.2. Pripravili smo 6 paralelk raztopin vzorca, izvedeno analizo pa smo uporabili tudi za selektivnost in robustnost metode (tj. za stabilnost vzorcev in standardov pri 0 h).

Iz rezultatov vsebnosti vseh 6 paralelek smo izračunali povprečno vsebnost piridoksinijevega klorida oz. tiaminijevega klorida (na snov kot je) v posameznem vzorcu. Izračunali smo RSD ($n = 6$) povprečnih vsebnosti in interval zaupanja meritev vsebnosti pri 95 % ($n = 6$; $t_{\text{tab}} = 2,571$) zanesljivosti.

- **Linearnost metode in točnost metode**

Analizo linearnosti in točnosti metode smo izvedli istočasno. Celotno analizo smo izvajali s standardnimi raztopinami piridoksinijevega klorida (delovni standard) oz. tiaminijevega klorida (delovni standard). Najprej smo pripravili tri osnovne standardne raztopine, iz katerih smo potem ločeno pripravili 5 točk v območju od 50 % do 150 % ciljne koncentracije standarda. Podatke pri 80 %, 100 %, 120 % koncentraciji smo uporabili tudi za določanje točnosti metode.

Priprava standardov za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida oz. tiaminijevega klorida po USP metodi je opisana v poglavju 3.2.2.1. oz. 3.2.2.2. Ker smo osnovne raztopine standardov poleg določitve ustreznosti kromatografskega sistema v tem primeru potrebovali tudi za raztopine za linearnost oz. točnost metode, smo jih zato pripravili v večjih količinah (50 mg/100 mL MF za osnovno razt. standarda piridoksinijevega klorida oz. 150 mg/150 mL MF za osnovno razt. standarda tiaminijevega klorida).

Priprava raztopin piridoksinijevega klorida za linearnost in točnost: V 100 mL merilne bučke smo natančno odpipetirali predpisane količine osnovne raztopine delovnega standarda piridoksinijevega klorida (preglednica X). Dodali smo 1,0 mL raztopine internega standarda (priprava glej poglavje 3.2.2.1.) in dopolnili z MF do oznake.

Priprava raztopin tiaminijevega klorida za linearnost in točnost: V 50 mL merilne bučke smo natančno odpipetirali predpisane količine osnovne raztopine delovnega standarda tiaminijevega klorida (preglednica XI). Dodali smo 5,0 mL raztopine internega standarda (priprava glej poglavje 3.2.2.2.) in dopolnili z MF do oznake.

Preglednica X: Priprava raztopin piridoksinijevega klorida za določanje linearnosti in točnosti.

Koncentracija standarda* [%]	Volumen osnovne raztopine standarda piridoksinijevega klorida [mL]
50	5,0
80	8,0
100**	10,0**
120	12,0
150	15,0

* Glede na predpisano vrednost v farmakopeji ($c = 0,05 \text{ mg/mL}$).

** Na tak način smo pripravili tudi standardne raztopine za potrebe ustreznosti kromatografskega sistema.

Preglednica XI: Priprava raztopin tiaminijevega klorida za določanje linearnosti in točnosti.

Koncentracija standarda* [%]	Volumen osnovne raztopine standarda tiaminijevega klorida [mL]
50	10,0
80	16,0
100**	20,0**
120	24,0
150	30,0

* Glede na predpisano vrednost v farmakopeji ($c = 0,40 \text{ mg/mL}$)

** Na tak način smo pripravili tudi standardne raztopine za potrebe ustreznosti kromatografskega sistema

Iz rezultatov analize oz. površin vrhov iskanega analita in internega standarda smo za posamezno meritev izračunali izmerjeno koncentracijo iskanega analita po *enačbi 15*:

$$\begin{aligned} \text{Izmerjena konc.} &= (r \text{ vz} / r \text{ st}) \times \text{konc. st} (\mu\text{g/mL}) \\ &= (r \text{ vz} / r \text{ st}) \times m(\text{st}) \times (P/100) / R_{\text{st}} 1000 \end{aligned}$$

Enačba 15: Izračun izmerjene koncentracije proučevanega analita.

$r \text{ vz}$... razmerje med površino vrha iskanega analita (piridoksinijev klorid oz. tiaminijev klorid) in površino vrha IS v raztopini vzorca ($A_{\text{analit}}/A_{\text{IS}}$)

r st ... razmerje med površino vrha iskanega analita (piridoksinijev klorid oz. tiaminijev klorid) in površino vrha IS v *raztopini standarda* ($A_{\text{analit}}/A_{\text{IS}}$)

m (st).. masa standarda [mg]

P... vsebnost standarda; 99,98 % za piridoksinijev klorid;

95,82 % za tiaminijev klorid (izračun: $(99,6 \%/100) \times (100 - 3,8 \%) = 95,82 \%$)

R st... faktor redčenja standarda (1000 za piridoksinijev klorid; 375 za tiaminijev klorid)

S pomočjo zatehte in vsebnosti vzorca, tj. v našem primeru osnovna standardna raztopina, pa smo izračunali dodano koncentracijo iskanega analita po spodnji enačbi (*enačba 16*).

$$\text{Dodana konc.} = m(\text{vz}) \times (P\text{vz}/100)/\text{volumen redčenja} \times 1000$$

Enačba 16: Izračun dodane konc. proučevanega analita.

m vz... zatehta vzorca oz. v tem primeru zatehta za osnovno standardno razt.

P vz... vsebnost vzorca oz. v našem primeru je to vsebnost standarda;

99,98 % za piridoksinijev klorid;

95,82 % za tiaminijev klorid (izračun: $(99,6 \%/100) \times (100 - 3,8 \%) = 95,82\%$)

Volumen redčenja... redčenje osnovne standardne raztopine

Iz izmerjene in dodane konc. smo izračunali izkoristek po *enačbi 17*:

$$\text{Izkoristek [\%]} = (\text{izmerjena konc.} / \text{dodana konc.}) \times 100$$

Enačba 17: Izračun izkoristka [%].

Iz *enačbe 17* smo torej **za točnost** izračunali izkoristke pri 80 %, 100 % in 120 % ciljnih koncentracijah analita. Izračunali smo tudi SD in RSD znotraj območij posameznih koncentracij.

Za določitev **linearnosti** metode pa smo iz vseh podatkov razmerij med površino vrha iskanega analita (piridoksinijev klorid oz. tiaminijev klorid) in površino vrha IS pri različnih koncentracijah standardnih raztopin narisali regresijsko premico v odvisnosti od dodane konc. iskanega analita (pri različnih koncentracijah standardov). Uporabili smo

metodo najmanjših kvadratov. Regresijske premice smo narisali v območju 50 % – 150 %. Za vsako paralelko smo izračunali tudi enačbo premice, iz katere smo odčitali presečišče z y osjo.

Odstotek odstopanja od presečišča z y osjo smo izračunali za vsako premico posebej in sicer kot količnik med presečiščem z y osjo in razmerjem med površino vrha iskanega analita (piridoksinijev klorid oz. tiaminijev klorid) in površino vrha IS v *raztopini standarda*. Izračun je prikazan v *enačbi 18*.

$$\% \text{ presečišča} = \frac{\text{presečišče z y osjo} \times 100}{r \text{ st}}$$

Enačba 18: Izračun odstotka presečišča; (r st pomeni razmerje med površino vrha iskanega analita in površino vrha IS v raztopini standarda) .

- **Robustnost metode: stabilnost raztopin vzorcev in standardov**

Za ugotavljanje stabilnosti raztopin smo uporabili raztopine vzorcev in standardov, ki smo jih pripravili za določanje natančnosti metode. Pripravljene raztopine smo pomerili takoj po pripravi (0 h), nato pa smo jih shranjevali 24 h (oz. nekatere 72 h) pod pogoji, ki so navedeni v preglednici XII in XIII. Po pretečenem času smo raztopine standardov in vzorcev ponovno analizirali ter jim določili vsebnost pod enakimi kromatografskimi pogoji kot v času 0 h (glej preglednici IV in V). Kriteriji za robustnost metode oz. stabilnost raztopin vzorcev in standardov so prikazani v preglednici IX.

Preglednica XII: Pogoji shranjevanja raztopin vzorcev in standardov piridoksinijevega klorida.

Paralelka	Pogoji shranjevanja raztopin piridoksinijevega klorida
Vz. 1 - 3	Sobna temperatura, svetloba, 24 h, bučka
Vz. 4 - 6	Vzorčevalnik (22 °C), tema, 24 h, viala
Standard 1 - 3	Sobna temperatura, svetloba, 72 h, bučka
Standard 1 - 3	Vzorčevalnik (22 °C), tema, 72 h, viala

Preglednica XIII: Pogoji shranjevanja raztopin vzorcev in standardov tiaminijevega klorida.

Paralelka	Pogoji shranjevanja raztopin tiaminijevega klorida
Vz. 1 - 3	Sobna temperatura, svetloba, 24 h, bučka
Vz. 4 - 6	Vzorčevalnik (22 °C), tema, 24 h, viala
Standard 1 - 3	Sobna temperatura, svetloba, 24 h, bučka
Standard 1 - 3	Vzorčevalnik (22 °C), tema, 24 h, viala

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 DOLOČANJE VSEBNOSTI PIRIDOKSINIJEVEGA KLORIDA

4.1.1 PODOJANJE REZULTATOV VALIDACIJE

Zaradi lažje predstavitve rezultatov bomo v nadaljevanju vse rezultate prikazovali kot odstotek piridoksinijevega klorida na snov, kot je. V farmakopeji (PhEur, USP) sicer obe monografiji in specifikacijski meji (PhEur; 99,0 – 101,0 %; USP: 98,0 – 102,0 %) za ta vitamin navajata, da je rezultate treba izražati na suho snov. Ker je namen validacije dokazati, da sta metodi ustrezni za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida, odstotka izgube pri sušenju pri podajanju rezultatov v nadaljevanju ne bomo upoštevali, saj njegova vrednost ne vpliva na oceno ustreznosti metode.

V *enačbi 19* je informativno prikazan preračun dejanskih rezultatov na suho snov, pri čemer smo kot odstotek izgube pri sušenju upoštevali 0 % (to je rezultat iz analitskega izvida piridoksinijevega klorida).

$$\% \text{ pirid. klorida na sušeno snov} = \frac{\% \text{ pirid. klorida na snov kot je}}{(100 - \text{IPS})} \times 100$$

Enačba 19: Preračun rezultatov vsebnosti piridoksinijevega klorida na suho snov (IPS-izguba pri sušenju = 0 %).

Najnižji rezultat skozi celotno validacijo vzorca je 99,25 % (titracija) oz. 99,95 % (HPLC). Oba rezultata sta v tem primeru podana na snov, kot je. V kolikor podana rezultata z *enačbo 19* preračunamo na suho snov, dobimo enake vrednosti, oba rezultata torej ustrezata specifikacijskim mejam.

Najvišji validacijski rezultat vzorca je 100,52 % piridoksinijevega klorida na snov, kot je (titracija) oz. 101,43 % piridoksinijevega klorida na snov, kot je (HPLC). Tudi v tem primeru po preračunu rezultatov na suho snov (*enačba 19*) dobimo enaki vrednosti, zato lahko zaključimo, da so vsi rezultati validacijske študije znotraj specifikacijskih (farmakopejskih) mej za posamezno metodo.

4.1.2 NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

V preglednici XIV in XV so prikazani rezultati in statistična obdelava 6 zaporednih meritev za določanje ponovljivosti metode piridoksinijevega klorida s titracijo oz. HPLC metodo. Rezultati so podani na snov, kot je.

Preglednica XIV: Rezultati ugotavljanja natančnosti titracijske metode za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida znotraj enega dneva.

Paralelka	VSEBNOST (na snov kot je) [%]
1	99,86
2	99,83
3	99,86
4	99,81
5	99,93
6	99,89
Povprečje [%]:	99,86
SD [%]:	0,04
RSD [%]:	0,04
95 % interval zaupanja: <i>n = 6; t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571</i>	99,76 – 99,97

Preglednica XV: Rezultati ugotavljanja natančnosti HPLC metode za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida znotraj enega dneva.

Paralelka	VSEBNOST (na snov kot je) [%]
1	100,70
2	100,40
3	100,39
4	100,37
5	100,33
6	101,34
Povprečje [%]:	100,59
SD [%]:	0,39
RSD [%]:	0,39
95 % interval zaupanja: <i>n = 6; t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571</i>	99,58 – 101,59

Iz rezultatov obeh analiz vidimo, da so si izmerjeni rezultati zelo podobni. Vse meritve ustrezajo 95 % intervalu zaupanja meritev, ki smo ga izračunali s pomočjo SD in t_{tab} . Povprečna vsebnost, pri titraciji znaša 99,86 % oz. 100,59 % pri HPLC, kar je primerljivo. RSD pri meritvah s titracijo znaša 0,04 %, pri HPLC metodi pa 0,39 %. V obeh primerih rezultati ustrezajo specifikacijskim mejam (rezultati na suho snov so enaki kot rezultati na

snov kot je; glej *enačba 19*) in validacijskim kriterijem, ki so navedeni v preglednici VI in IX. Zaključimo lahko, da sta obe metodi natančni oz. ponovljivi oz. med njima ni bistvenih razlik. Pri titraciji je sicer opazno nekoliko manjše sipanje rezultatov, s čimer bi lahko opredelili večjo ponovljivost metode, vendar se moramo zavedati, da je to lahko zgolj naključje oz. je nekoliko višji RSD pri HPLC posledica (višjega) 6. rezultata, kjer bi lahko prišlo tudi do manjše analitske napake (npr. pri pipetiranju). Kljub temu so te napake zanemarljive.

4.1.3 TOČNOST METODE

Točnost metode smo določili v treh koncentracijah raztopin vzorca (80 %, 100 % in 120 % točka glede na predpis v farmakopeji; koncentracija pri 100 % točki = 2,73 mg/mL za titracijo oz. 0,05 mg/mL za HPLC) in sicer vsako v treh paralkelah. V preglednici XVI so prikazani rezultati določanja s titracijo, v preglednici XVII pa s HPLC metodo.

Preglednica XVI: Rezultati ugotavljanja točnosti titracijske metode za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida.

Paralelka	masa vzorca [mg]	Volumen 0,1 M HClO ₄ [mL]	Dodana množina [mmol]	Izmerjena množina [mmol]	Izkoristek [%]	Povprečni rezultati za posamezno koncentracijsko vrednost	
80 %							
1.	118,84	5,801454	0,577224	0,578231	100,17	Povprečje [%]	99,41
2.	119,24	5,734816	0,579167	0,571589	98,69	SD [%]	0,74
3.	119,93	5,831953	0,582518	0,578912	99,38	RSD [%]	0,74
95 % interval zaupanja: $n = 3$, $t(0,05, n-1) = 4,303$: 96,23 % – 102,59 %							
100 %							
1.	148,45	7,243147	0,721044	0,721924	100,12	Povprečje [%]	99,35
2.	149,38	7,132110	0,725561	0,710857	97,97	SD [%]	1,20
3.	149,88	7,324030	0,727990	0,727792	99,97	RSD [%]	1,21
95 % interval zaupanja: $n = 3$, $t(0,05, n-1) = 4,303$: 94,19 % – 104,51 %							
120 %							
1.	178,69	8,693223	0,867924	0,866454	99,83	Povprečje [%]	99,70
2.	179,70	8,765010	0,872830	0,873609	100,09	SD [%]	0,46
3.	177,03	8,577677	0,859861	0,852881	99,19	RSD [%]	0,46
95 % interval zaupanja: $n = 3$, $t(0,05, n-1) = 4,303$: 97,72 % – 101,68 %							
Celotno povprečje ($n = 9$) [%] 99,49							
SD [%] 0,76							
RSD [%] 0,76							

Iz rezultatov v preglednici XVI lahko vidimo, da so vsi posamezni izkoristki znotraj območja 97,0 % – 103,0 %, kar ustreza kriterijem za točnost (preglednica VI). Tudi celotni povprečni izkoristek (99,49 %) in RSD (0,76 %) vseh 9 meritev sta v ustreznem območju, zato lahko zaključimo, da je titracijska metoda za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida točna v območju 80 % – 120 % (tj. 2,184 mg/mL – 3,276 mg/mL).

Preglednica XVII: Rezultati ugotavljanja točnosti HPLC metode za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida.

Paralelka	Redčenje	Razmerje (A_{vz}/A_{IS})	Dodana konc. [$\mu\text{g/mL}$]	Izmerjena konc. [$\mu\text{g/mL}$]	Izkoristek [%]	Povprečni rezultati za posamezno koncentracijsko vrednost	
80 %							
1.	1250	0,976108	39,8000	39,9354	100,34	Povprečje [%]	100,33
2.	1250	0,973449	39,7920	39,8266	100,09	SD [%]	0,24
3.	1250	0,980393	39,88802	40,1107	100,56	RSD [%]	0,24
95 % interval zaupanja: $n = 3$, $t(0,05, n-1) = 4,303$: 99,30 % – 101,36 %							
100 %							
1.	1000	1,215611	49,7500	49,7341	99,97	Povprečje [%]	100,00
2.	1000	1,214109	49,7401	49,6727	99,86	SD [%]	0,15
3.	1000	1,220587	49,8600	49,9377	100,16	RSD [%]	0,15
95 % interval zaupanja: $n = 3$, $t(0,05, n-1) = 4,303$: 99,35 % – 100,65 %							
120 %							
1.	833,33	1,462976	59,7003	59,8545	100,26	Povprečje [%]	100,07
2.	833,33	1,458656	59,6883	59,6778	99,98	SD [%]	0,17
3.	833,33	1,461815	59,8323	59,8070	99,96	RSD [%]	0,17
95 % interval zaupanja: $n = 3$, $t(0,05, n-1) = 4,303$: 99,34 % – 100,80 %							
Celotno povprečje ($n = 9$) [%] 100,13							
SD [%] 0,22							
RSD [%] 0,22							

Tudi pri HPLC metodi so vsi posamezni izkoristki ustrezni, saj so znotraj območja 98,0 % – 102,0 %. RSD vseh 9 meritev je 0,22 %, celotno povprečje izkoristkov pa 100,13 %, kar ustreza predpisanim kriterijem v preglednici IX. Tudi HPLC metoda za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida je točna v danem območju 80 % – 120 % (tj. 0,04 mg/mL – 0,06 mg/mL). Obe metodi dajeta primerljive rezultate.

4.1.4 LINEARNOST METODE

Za izvedbo analize določanja linearnosti metode smo uporabili 3 paralelke raztopine vzorca (titracija) oz. delovnega standarda (HPLC) piridoksinijev klorid v koncentraciji 50 %, 80 %, 100 %, 120 % in 150 % glede na predpis v farmakopeji ($c = 2,73 \text{ mg/mL}$ za titracijo oz. $0,05 \text{ mg/mL}$ za HPLC). V preglednici XVIII in XIX so prikazani podatki, ki smo jih uporabili za določanje regresijske premice s titracijsko metodo.

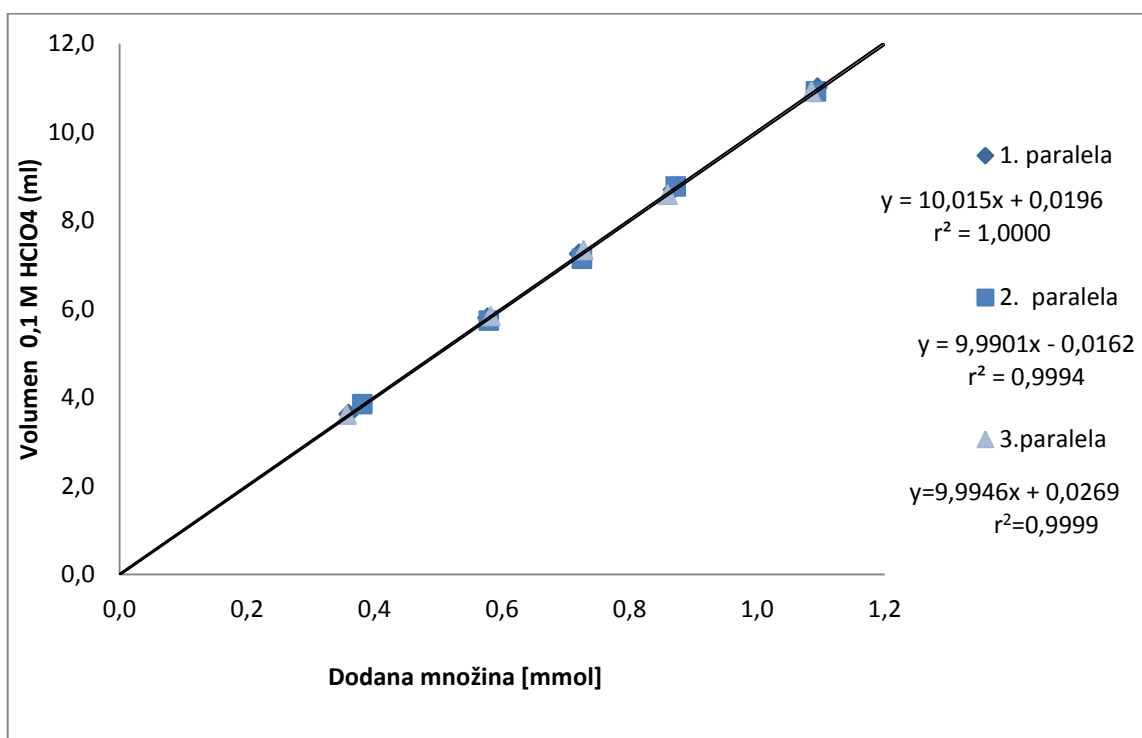
Preglednica XVIII: Rezultati ugotavljanja linearnosti titracijske metode za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida.

Koncentracija vzorca* [%]	Masa vzorca [mg]	Volumen 0,1 M HClO ₄ [mL]	Dodana množina [mmol]
1. paralelka			
49	73,97	3,621969	0,359283
79	118,84	5,801454	0,577224
99	148,45	7,243147	0,721044
119	178,69	8,693223	0,867924
150	225,48	10,999807	1,095190
2. paralelka			
52	78,45	3,848279	0,381043
79	119,24	5,734816	0,579167
100	149,38	7,132110	0,725561
120	179,7	8,765010	0,872830
150	224,93	10,913833	1,092519
3. paralelka			
49	73,37	3,603415	0,356369
80	119,93	5,831953	0,582518
100	149,88	7,324030	0,727990
118	177,03	8,577677	0,859861
149	223,49	10,900623	1,085524

* Glede na predpisano koncentracijo vzorca v farmakopeji ($c = 2,73 \text{ mg/mL}$).

Preglednica XIX: Rezultati izračuna regresijske premice za titracijsko metodo za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida.

Statistika			
Paralelka	1	2	3
r (korelacijski koef.)	1,0000	0,9997	0,9999
% odseka na y osi (glede na odziv pri 100 % konc. vzorca)	0,26	- 0,22	0,36
Naklon	10,0152	9,9901	9,9946
Odsek na y osi	0,0196	- 0,0162	0,0269



Slika 8: Regresijske premice vseh treh paralelk določanja vsebnosti piridoksinijevega klorida s titracijsko metodo.

Na sliki 8 so prikazane regresijske premice za vse 3 paralelke določanja vsebnosti piridoksinijevega klorida s titracijsko metodo. Razvidno je, da so vse 3 premice linearne, saj je $r > 0,998$. Presečišča z y osjo (glede na odziv pri 100 % koncentraciji vzorca), ki bi glede na validacijski kriterij lahko odstopala za $\pm 5 \%$ so ustrezna, saj znašajo 0,26 %, - 0,22 % in 0,36 % (preglednica XIX). Tudi nakloni premic se dobro medsebojno ujemajo (še posebej 2. in 3.), zato lahko zaključimo, da je metoda linearna v območju

50 % – 150 % predpisane koncentracije vzorca v farmakopeji (tj. 1,375 mg/mL – 4,095 mg/mL).

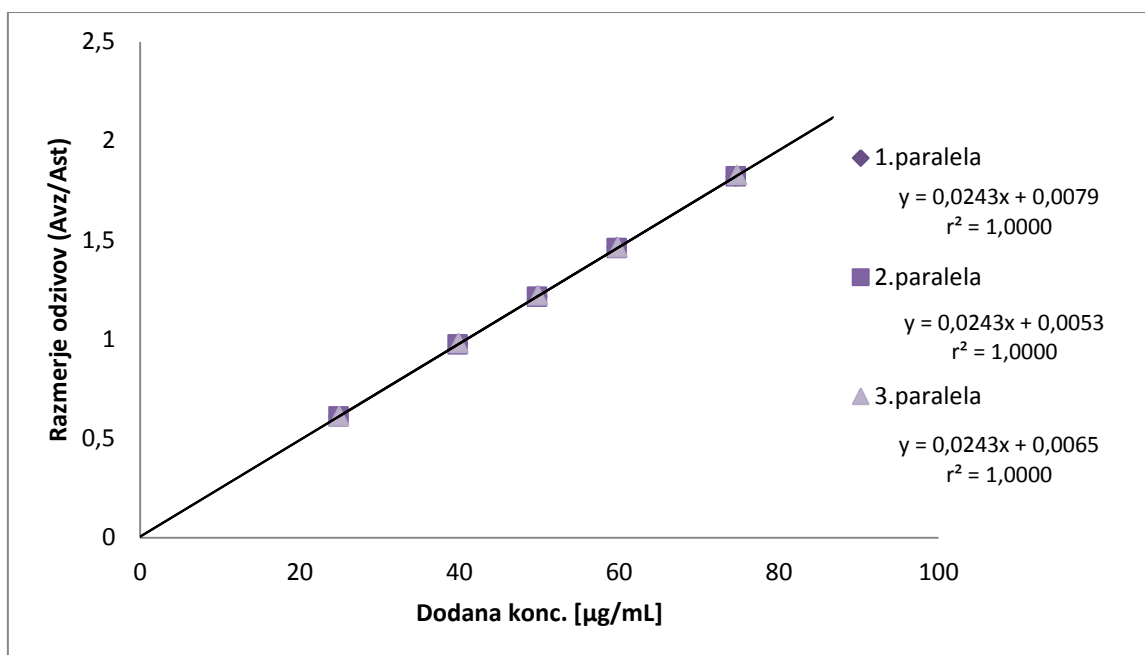
Preglednica XX: Rezultati ugotavljanja linearnosti HPLC metode za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida.

Koncentracija standarda* [%]	Redčenje	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{IS})	Dodana konc. [$\mu\text{g/mL}$]
1. paralelka			
49,76	2000	0,611264	24,8750
79,62	1250	0,976108	39,8000
99,52	1000	1,215611	49,7500
119,40	833,33	1,462976	59,7003
149,61	666,67	1,819089	74,6247
2. paralelka			
49,75	2000	0,610753	24,8700
79,79	1250	0,973449	39,7920
99,50	1000	1,214109	49,7401
119,69	833,33	1,458656	59,6883
149,25	666,67	1,820441	74,6097
3. paralelka			
49,87	2000	0,611871	24,93001
79,79	1250	0,980393	39,88802
99,74	1000	1,220587	49,86003
119,69	833,33	1,461815	59,83227
149,61	666,67	1,827395	74,78967

* Glede na predpisano koncentracijo v farmakopeji ($c = 0,05 \text{ mg/mL}$).

Preglednica XXI: Rezultati izračuna regresijske premice za HPLC metodo za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida.

Statistika			
Paralelka	1	2	3
r (korelacijski koef.)	1,0000	1,0000	1,0000
% odseka na y osi (glede na razmerje odzivov pri 100 % konc. standarda)	0,65	0,44	0,54
Naklon	0,0243	0,0243	0,0243
Odsek na y osi	0,0079	0,0053	0,0065



Slika 9: Regresijske premice vseh treh paralelk določanja vsebnosti piridoksinijevega klorida s HPLC metodo

Na sliki 9 so prikazane regresijske premice za vse 3 paralelke določene s HPLC metodo. Premice smo narisali s pomočjo podatkov v preglednicah XX in XXI. S slike je razvidno, da so tudi tukaj vse 3 krivulje linearne, njihov r namreč znaša 1,000 ($r > 0,998$). Odstopanja odseka od y osi (glede na razmerje odzivov pri 100% konc. standarda) so sicer nekoliko višja kot pri titracijski metodi (0,65 %, 0,44 % in 0,54 %), vendar pa prav tako ustrezajo kriteriju ± 5 % (preglednica IX).

Povzamemo torej lahko, da sta obe metodi linearni v območju 50 % – 150 % glede na predpis v farmakopeji (titracija: 1,375 mg/mL – 4,095 mg/mL; HPLC: 0,025 mg/mL – 0,075 mg/mL). V kolikor metodi primerjamo med seboj, ugotovimo, da je pri HPLC metodi nekoliko večji odstotek odseka na y osi, iz česar lahko predvidevamo, da je pri pripravi raztopin prišlo do analitske napake. Kljub temu lahko vseeno trdimo, da sta obe metodi povsem primerljivi in ustrezni glede na validacijske kriterije.

4.1.5 ROBUSTNOST METODE (STABILNOST RAZTOPIN VZORCEV IN STANDARDOV)

Preglednica XXII: Stabilnost raztopin vzorcev piridoksinijevega klorida, določenih s titracijsko metodo; T pomeni temperatura.

Paralelka	Pogoj shranjevanja	VSEBNOST [%] (na snov kot je)	Sprememba vsebnosti glede na 0 h [%]
1	Sobna T 0 h	99,25	/
Stabilnost 1 h			
2	Sobna T/svetloba 1 h	100,52	1,3
3	Sobna T/tema 1 h	100,35	1,1
Stabilnost 2 h			
4	Sobna T/svetloba 2 h	101,01	1,8
5	Sobna T/tema 2 h	100,30	1,1
Stabilnost 3 h			
6	Sobna T/svetloba 3 h	100,47	1,2
7	Sobna T/tema 3 h	100,22	1,0
Stabilnost 0,5 h			
/	Sobna T, 0 h	99,85	/
8	Sobna T/svetloba, 0,5 h	100,38	0,5
9	Sobna T/tema, 0,5 h	99,32	- 0,5

V preglednici XXII so prikazani rezultati vsebnosti piridoksinijevega klorida v raztopini vzorcev, določenih po 0 h, 1 h, 2 h, 3 h in 30 min pri shranjevanju na sobni temperaturi v temi oz. na svetlobi. Iz preglednice lahko odčitamo relativno spremembo vsebnosti glede na 0 h, in sicer glede na kriterij v preglednici VI, je dovoljena sprememba lahko največ $\pm 0,5$ %. Iz rezultatov je razvidno, da temu kriteriju ustrezata le paralelki 8 in 9, ki smo jih titrirali po 30 min shranjevanja v temi oz. na svetlobi pri sobni temperaturi.

Zaključimo torej lahko, da so raztopine vzorcev pripravljene po tej metodi stabilne največ 30 minut po pripravi. Raztopine moramo zato pripravljati sproti oz. šele tik pred meritvijo.

V kolikor rezultate preračunamo na suho snov (*enačba 19*), lahko ugotovimo, da so vse vrednosti znotraj specifikacijskih mej. Podajanje rezultatov bi bilo bolj natančno, če bi namesto meritve pri času 0 h uporabili povprečni rezultat 6 meritev pri določanju natančnosti metode. S tem bi naredili manjšo napako in rezultat bi bil bolj pravilen. Domnevamo namreč, da je ravno rezultat 1. paralelke (pri 0 h) rahlo zanihal navzdol in

zato je možno, da so vzorci stabilni, če jih primerjamo glede na povprečen rezultat iz natančnosti metode. Analizo bi lahko izvedli bolj pravilno tudi tako, da bi pripravili samo eno raztopino vzorca, vendar v večji količini (npr. 500 mL). Raztopino bi razdelili v dve erlenmajerici (tj. 2×250 mL), pri čemer bi eno shranjevali na svetlobi, drugo pa v temi. Obe raztopini bi nato titriral v določenih časovnih intervalih, tako da bi vsakič odvzeli enak volumen (npr. 50 mL) dane raztopine. S tem bi dosegli, da bi vsakič titriral isto raztopino in tako bi naredili manjšo napako pri primerjavi rezultatov.

Preglednica XXIII: Stabilnost raztopin vzorcev piridoksinijevega klorida, določenih s HPLC metodo.

VSEBNOST VZORCEV [%] (na snov kot je)				
Paralelka	Sobna T / svetloba		Vzorčevalnik (22 °C)/tema	
	0 h [%]	24 h [%]	0 h [%]	24 h [%]
1	100,70	100,50	100,37	100,43
2	100,40	100,09	100,33	100,32
3	100,39	99,95	101,34	101,43
Povprečje (n = 3) [%]	100,50	100,18	100,68	100,73
SD (n = 3) [%]	0,17	0,29	0,57	0,61
RSD (n = 3) [%]	0,17	0,29	0,57	0,61
Relativna razlika [%]	- 0,3		0,0	
Absolutna razlika [%]	0,32		0,05	
Povprečje (n = 6) [%]	100,34		100,70	
SD [%]	0,27		0,53	
RSD [%]	0,27		0,53	
95 % interval zaupanja [%]	99,63 – 101,04		99,34 – 102,07	

V preglednici XXIII so prikazani rezultati vsebnosti vzorcev pri 0 h in po 24 h shranjevanja na svetlobi (pri sobni temperaturi) oz. v avtomatskem vzorčevalniku (pri 22 °C, v temi). Prikazano je povprečje rezultatov 3 paralelek pri posameznem pogoju, RSD in relativna razlika med 0 h in 24 h pri določenem pogoju. Če rezultate preračunamo na suho snov (*enačba 19*), ugotovimo, da so vse vrednosti znotraj specifikacijskih mej, glede na validacijski kriterij v preglednici IX pa je ustrezen tudi RSD pri posameznem pogoju shranjevanja. Relativna sprememba povprečne vsebnosti glede na čas 0 h pri vzorcih, ki smo jih shranjevali na svetlobi, znaša - 0,3 % pri vzorcih shranjenih v avtomatskem

vzorčevalniku pa 0,0 %. Oba rezultata sta manjša od $\pm 1,0$ % (glede na 0 h) in zato ustrezata kriteriju za robustnost metode. HPLC metoda je torej robustna, oz. raztopine vzorcev pripravljene po tej metodi so stabilne tudi po 24 h shranjevanja na svetlobi ali v temi.

Podobno kot raztopine vzorcev smo analizirali tudi standardne raztopine (v treh paralelkah), in sicer (pri sobni temperaturi) na svetlobi in v temi (v avtomatskem vzorčevalniku pri 22 °C). Rezultati po 0 h in 72 h so prikazani v preglednici XXIV. Glede na kriterij za stabilnost raztopin standardov (preglednica IX) so vse posamezne in povprečne spremembe odzivov glede na čas 0 h pri danih pogojih manjše od $\pm 1,0$ %. Zaključimo lahko, da so raztopine standardov pripravljene po tej metodi stabilne tudi po 72 h shranjevanja na svetlobi ali v temi.

Preglednica XXIV: Stabilnost raztopin standardov piridoksinijevega klorida, določenih s HPLC metodo.

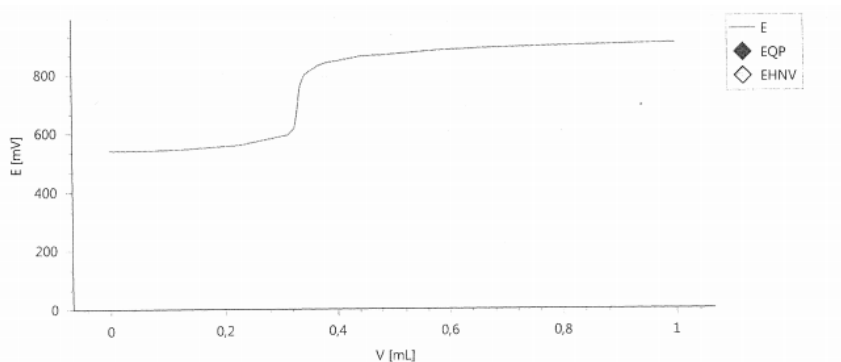
Stabilnost standardnih raztopin po 72 h, 22 °C, vzorčevalnik, tema						
čas	Standard 1		Standard 2		Standard 3	
	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]
0 h	1,223048	-	1,221818	-	1,218654	-
72 h	1,220808	0,2	1,220445	- 0,1	1,218466	0,0
Povprečje rel. razlika, 72 h [%]	- 0,1					
Stabilnost standardnih raztopin po 72 h, sobna T, svetloba						
čas	Standard 1		Standard 2		Standard 3	
	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]
0 h	1,223048	-	1,221818	-	1,218654	-
72 h	1,217971	- 0,4	1,219345	- 0,2	1,210728	- 0,7
Povprečje rel. razlika, 72 h [%]	0,4					

4.1.6 SELEKTIVNOST/SPECIFIČNOST METODE

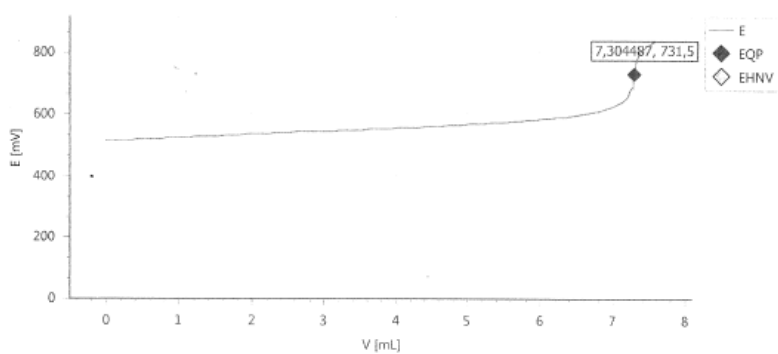
Selektivnost in specifičnost metode smo izvedli istočasno z določanjem natančnosti metode znotraj enega dneva.

Pri titraciji smo kot rezultat prikazali titracijsko krivuljo za raztopino slepega vzorca (slika 10) in raztopino vzorca (slika 11).

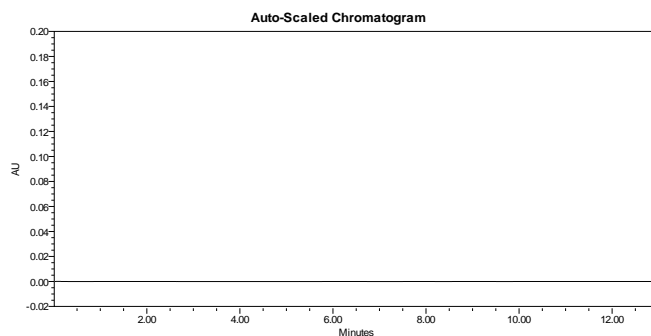
Pri HPLC metodi smo za prikaz selektivnosti uporabili kromatograme topila (slika 12), standardne raztopine (slika 13) in raztopine vzorca (slika 14).



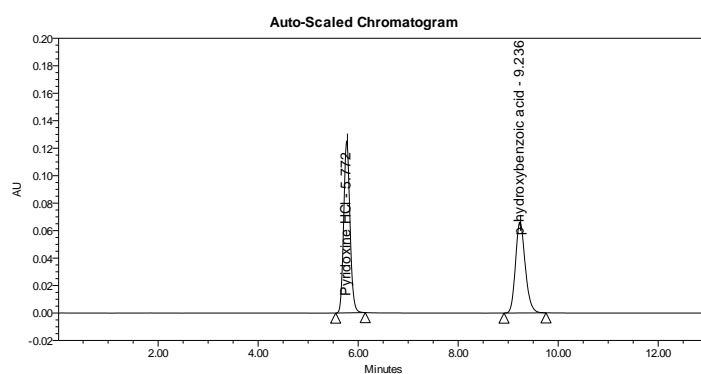
Slika 10: Krivulja slepe raztopine določena z metodo titracije za določitev vsebnosti piridoksinijevega klorida.



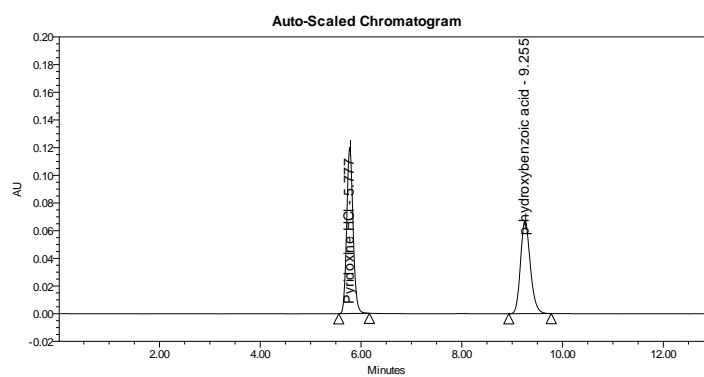
Slika 11: Krivulja raztopine vzorca določena z metodo titracije za določitev vsebnosti piridoksinijevega klorida.



Slika 12: Kromatogram topila pri HPLC metodi za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida.



Slika 13: Kromatogram standardne raztopine pri HPLC metodi za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida. Prvi vrh prikazuje iskani analit (piridoksinijev klorid), drugi vrh pa je interni standard (4-hidroksibenzojska kislina).



Slika 14: Kromatogram raztopine vzorca pri HPLC metodi za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida. Prvi vrh prikazuje iskani analit (piridoksinijev klorid), drugi vrh pa je interni standard (4-hidroksibenzojska kislina).

Ugotovili smo, da je HPLC metoda bolj selektivna od titracijske metode.

Titracijska metoda je specifična in tako neselektivna na morebitne prisotne sorodne snovi, ki vsebujejo bazične funkcionalne skupine (teoretično bi lahko bile v raztopini vzorca). Te nečistote se lahko titrirajo poleg analita in bi posledično določili lažno višji rezultat preiskovanega analita. Metoda je selektivna na šibke baze. Z ostalimi specifikacijskimi parametri zagotavljamo, da teh v vzorcu ni prisotnih v signifikantni koncentraciji.

HPLC metoda je bolj selektivna od titracijske metode, saj je odvisna od več fizikalno kemijskih lastnosti, ne samo prisotnosti bazičnih funkcionalnih skupin. Te lastnosti so npr. vodikove vezi, hidrofilne in hidrofobne interakcije, ionizirajoče funkcionalne skupine ...

4.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI TIAMINIJEVEGA KLORIDA

4.2.1 PODOJANJE REZULTATOV VALIDACIJE

Zaradi lažje predstavitve rezultatov bomo v nadaljevanju vse rezultate prikazovali kot odstotek tiaminijevega klorida na snov, kot je. V farmakopejah (PhEur, USP) sicer obe monografiji in specifikacijski meji (PhEur: 98,5 - 101,0 %; USP: 98,0 - 102,0 %) za ta vitamin navajata, da je rezultate treba izražati na brezvodno snov, toda ker je namen validacije dokazati, da sta metodi ustrezni za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida, odstotka vsebnosti vode pri podajanju rezultatov v nadaljevanju ne bomo upoštevali.

V *enačbi 20* je informativno prikazan preračun dejanskih rezultatov na brezvodno snov, pri čemer smo kot odstotek vode v vzorcu upoštevali 4,2 %, (to je rezultat iz analitskega izvida tiaminijevega klorida; določen s Karl-Fischer metodo).

$$\% \text{ tiamin. klorida na brezvodno snov} = \frac{\% \text{ tiamin. klorida na snov kot je}}{(100 - KF)} \times 100$$

Enačba 20: Preračun rezultatov vsebnosti tiaminijevega klorida na brezvodno snov (KF = vsebnost vode v vzorcu, določena s Karl-Fischer metodo; 4,2 %).

Najnižji rezultat vzorca pri HPLC metodi skozi celotno validacijo je 94,01 %, najvišji pa 95,16 %. Oba rezultata sta podana na snov kot je. V kolikor ju preračunamo na brezvodno snov (*enačba 20*), dobimo vrednosti 98,13 % in 99,33 %. Oba rezultata sta znotraj območja specifikacijskih mej po USP.

Tudi pri titraciji smo rezultate podajali na snov, kot je. Najnižji dosežen rezultat znaša 93,48 %, najvišji pa 97,28 %. Oba rezultata smo dobili pri določanju robustnosti metode (tj. stabilnost raztopin vzorcev) in po preračunu na brezvodno snov (*enačba 20*) ugotovimo, da sta obe vrednosti izven specifikacijskih mej po PhEur. Preračunani vrednosti sta namreč 97,58 % in 101,54 %, farmakopejski predpis pa zahteva območje 98,5 % – 101,0 %. Nekateri rezultati pri robustnosti metode so torej izven specifikacijskih mej, zato lahko trdimo, da smo raztopine vzorcev izpostavljali neustreznim pogojem. Pri določanju natančnosti metode so bili vsi rezultati znotraj specificiranih mej, tudi ko smo jih preračunali na brezvodno snov.

4.2.2 NATANČNOST METODE ZNOTRAJ ENEGA DNEVA (PONOVLJIVOST)

V preglednici XXV in XXVI so prikazani rezultati in statistična obdelava 6 zaporednih meritev za določitev ponovljivosti metode za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida s titracijo in HPLC metodo. Rezultati so podani na snov, kot je.

Preglednica XXV: Rezultati ugotavljanja natančnosti titracijske metode za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida znotraj enega dneva.

Paralelka	VSEBNOST (na snov kot je) [%]
1	95,28
2	96,15
3	96,13
4	96,18
5	95,99
6	96,17
Povprečje [%]:	95,98
SD [%]:	0,35
RSD [%]:	0,37
95 % interval zaupanja: <i>n = 6; t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571</i>	95,08 – 96,89

Preglednica XXVI: Rezultati ugotavljanja natančnosti HPLC metode tiaminijevega klorida znotraj enega dneva.

Paralelka	VSEBNOST (na snov kot je) [%]
1	94,40
2	94,01
3	94,14
4	94,18
5	94,17
6	94,61
Povprečje [%]:	94,25
SD [%]:	0,22
RSD [%]:	0,23
95 % interval zaupanja: <i>n = 6; t_{tab}(0,05, n-1) = 2,571</i>	93,70 – 94,81

Če primerjamo ponovljivost obeh metod, ugotovimo, da ni signifikantnih razlik med RSD (0,37 % in 0,23 %), iz česar lahko sklepamo, da sta obe metodi zelo natančni (kriterij: preglednica VI in IX) in primerni za tovrstno določanje vsebnosti. Obe metodi tudi ustrezata 95 % intervalu zaupanja meritev, nekoliko različna pa je povprečna vrednost vseh 6 meritev - za titracijo je to 95,98 %, za HPLC 94,25 %. V kolikor rezultate preračunamo na brezvodno snov, (to zahtevata USP in PhEur farmakopeja), ugotovimo, da vse vrednosti ustrezajo specifikacijskim mejam za posamezno metodo. Povprečni vrednosti na brezvodno snov znašata 100,19 % (titracija) oz. 98,38 % (HPLC).

Ugotovimo torej, da so rezultati dokaj primerljivi, kljub temu se med metodama razlikujejo za približno 2 %. Vzrok za tovrstno razliko je po vsej verjetnosti v uporabi prave vsebnosti standarda. Pri HPLC metodi smo namreč kot standard uporabili Sigma Aldrich delovni standard z deklarirano vsebnostjo 99,6 % na brezvodno snov. Torej bi praviloma pred začetno uporabo le temu morali določiti vsebnost vode, da bi dobili dejansko oz. pravilno vsebnost standarda na snov, kot je. Mi smo kot vsebnost vode v standardu upoštevali kar rezultat s certifikata standarda (tj. 3,8 % vode, določeno s KF metodo v 3 paralelkah), zato smo verjetno že tukaj naredili manjšo analitsko napako pri določanju vsebnosti standarda (pri izračunih smo upoštevali vsebnost 95,82 % na snov, kot je). Razlog za napako bi lahko bil tudi v pripravi raztopin, npr. napaka pri pipetiranju, vendar glede na to, da so rezultati zelo ponovljivi (RSD = 0,23 %) lahko to možnost izključimo. Nekoliko nižji rezultat pri HPLC metodi (oz. višji rezultat pri titraciji) je lahko tudi posledica same metode. Titracija je namreč neselektivna metoda, pri kateri dobimo kot rezultat zgolj titracijsko krivuljo in porabo titrne raztopine za doseg ekvivalentne točke, nimamo pa vpogleda v to, kaj se kemijsko dogaja z analitom oz. katere funkcionalne skupine se pri tem titrirajo. Teoretično bi se zato lahko v našem primeru poleg piridoksinijevega klorida (ki ga določamo) titrirale tudi kakšne druge snovi (npr. nečistote) in bi tako posledično dobili navidezno višjo vsebnost kot pri HPLC metodi.

Glede na validacijske kriterije za določanje vsebnosti lahko zaključimo, da sta obe metodi za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida natančni.

4.2.3 TOČNOST METODE

Tako kot pri piridoksinijevemu kloridu smo tudi pri tiaminijevemu kloridu točnost določali na vzorcu (titracija) oz. delovnem standardu (HPLC) tiaminijev klorid. Analizo smo izvedli v treh paralelkah, pri koncentracijah 80 %, 100 % in 120 % glede na predpis v

farmakopeji (koncentracija pri 100 % točki = 2,00 mg/mL za titracijo oz. 0,40 mg/mL za HPLC). V preglednici XXVII in XXVIII so prikazani rezultati določanja s titracijsko in HPLC metodo.

Preglednica XXVII: Rezultati ugotavljanja točnosti titracijske metode tiaminijevega klorida.

Paralelka	Masa vzorca [mg]	Volumen 0,1 M HClO ₄ [mL]	Dodana množina [mmol]	Izmerjena množina [mmol]	Izkoristek [%]	Povprečni rezultati za posamezno koncentracijsko vrednost
80 %						
1.	88,98	5,074380	0,506392	0,503322	99,39	Povprečje [%] 99,73
2.	89,00	5,084287	0,506506	0,504310	99,57	SD [%] 0,45
3.	87,53	5,024620	0,498140	0,499357	100,24	RSD [%] 0,45
95 % interval zaupanja: $n = 3, t(0,05, n-1) = 4,303 : 97,79 \% - 101,67 \%$						
100 %						
1.	108,27	6,149011	0,616173	0,610548	99,09	Povprečje [%] 98,86
2.	108,51	6,196112	0,617539	0,615248	99,63	SD [%] 0,90
3.	110,53	6,190189	0,629035	0,615657	97,87	RSD [%] 0,91
95 % interval zaupanja: $n = 3, t(0,05, n-1) = 4,303 : 94,99 \% - 102,73 \%$						
120 %						
1.	131,74	7,318545	0,749742	0,727244	97,00	Povprečje [%] 98,80
2.	133,94	7,642098	0,762263	0,759529	99,64	SD [%] 1,56
3.	132,15	7,538873	0,752076	0,750229	99,75	RSD [%] 1,58
95 % interval zaupanja: $n = 3, t(0,05, n-1) = 4,303 : 92,09 \% - 105,51 \%$						
Celotno povprečje (n = 9) [%] 99,13						
SD [%] 1,03						
RSD [%] 1,04						

Preglednica XXVIII: Rezultati ugotavljanja točnosti HPLC metode za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida.

Paralelka	Redčenje	Razmerje odzivov [A _{vz} /A _{IS}]	Dodana konc. [µg/mL]	Izmerjena konc. [µg/mL]	Izkoristek [%]	Povprečni rezultati za posamezno koncentracijsko vrednost
80 %						
1.	468,75	0,981084	305,4564	301,3779	98,66	Povprečje [%] 98,48
2.	468,75	0,981788	306,6622	301,5942	98,35	SD [%] 0,16
3.	468,75	0,980701	306,1103	301,2602	98,42	RSD [%] 0,16
95 % interval zaupanja: n = 3, t(0,05, n-1) = 4,303 : 97,79 % – 99,17 %						
100 %						
1.	375	1,229492	381,8205	377,6860	98,92	Povprečje [%] 99,05
2.	375	1,234963	383,3277	379,3667	98,97	SD [%] 0,19
3.	375	1,236577	382,6379	379,8624	99,27	RSD [%] 0,19
95 % interval zaupanja: n = 3, t(0,05, n-1) = 4,303 : 98,23 % – 99,87 %						
120 %						
1.	312,5	1,472354	458,1846	452,2905	98,71	Povprečje [%] 99,11
2.	312,5	1,493373	459,9933	458,7473	99,73	SD [%] 0,54
3.	312,5	1,478349	459,1655	454,1320	98,90	RSD [%] 0,54
95 % interval zaupanja: n = 3, t(0,05, n-1) = 4,303 : 96,79 % – 101,43 %						
Celotno povprečje (n = 9) [%] 98,88						
SD [%] 0,43						
RSD [%] 0,43						

Če primerjamo rezultate iz obeh preglednic, vidimo, da so vsi posamezni izkoristki ustrezni glede na kriterije. Pri titracijski metodi so izkoristki torej znotraj območja 97,0 % – 103,0 %, pri HPLC pa v območju 98,0 % – 102,0 %. Vse meritve tudi ustrezajo 95 % intervalu zaupanja meritev.

Celotno povprečje vseh 9 posameznih izkoristkov pri titraciji (preglednica XXVII) znaša 99,13 %. Rezultat je znotraj območja 98,0 % – 102,0 % in je zato ustrezen, prav tako tudi RSD celotnega izkoristka (1,04 %), ki je v našem primeru manjši od 2,0 %.

Pri HPLC metodi (preglednica XXVIII) je povprečje posameznih izkoristkov 98,88 %. Če to vrednost zaokrožimo na eno decimalno mesto (tako so vrednosti podane v kriteriju v

preglednici IX), povprečna vrednost znaša 99,0 % in je tako v ustreznem območju (oz. znotraj intervala 99,0 % – 101,0 %). Tudi RSD vseh izkoristkov je ustrezen (tj. 0,43 %; kriterij: ≤ 2 %).

Ugotovili smo, da obe metodi ustrezata predpisanim kriterijem in sta zato točni v območju 80 % – 120 % ciljne koncentracije analita (tj. 1,6 mg/mL – 2,4 mg/mL (titracija) oz. 0,32 mg/mL – 0,48 mg/mL (HPLC)). Pri titraciji so posamezni izkoristki nekoliko boljši od HPLC metode, izjema sta le 3. paralelka pri 100 % točki in 1. paralelka pri 120 % točki, ki nekoliko odstopata od ostalih vrednosti. V teh dveh točkah je verjetno prišlo do analitske napake, zato je tudi RSD vseh izkoristkov pri titraciji nekoliko višji kot pri HPLC metodi. Kljub temu pa so rezultati vseeno znotraj kriterijev.

Pri HPLC metodi opazimo bolj ponovljive izkoristke, vendar pa so ti nekoliko nižji. To je še posebej razvidno pri vseh treh 80 % točkah in posledično tudi pri celotnem povprečju izkoristkov, ki je ravno »na meji ustreznosti«. Vzrok za to bi lahko bil v vsebnosti delovnega standarda. Glede na to, da je pri HPLC metodi povprečje izkoristkov »na meji ustreznosti« lahko rečemo, da je v tem primeru titracijska metoda nekoliko bolj točna od HPLC metode.

4.2.4 LINEARNOST METODE

Linearnost smo tako kot pri piridoksinijevemu kloridu tudi pri tiaminijevemu kloridu določali pri 50 %, 80 %, 100 %, 120 % in 150 % koncentraciji vzorca (titracija) oz. delovnega standarda (HPLC) tiaminijev klorid, v 3 paralelkah (100 % koncentracija pri titraciji znaša 2,00 mg/mL oz. 0,40 mg/mL za HPLC). V preglednici XXIX in XXXI so prikazani rezultati, ki smo jih uporabili za izračun in določanje regresijske premice.

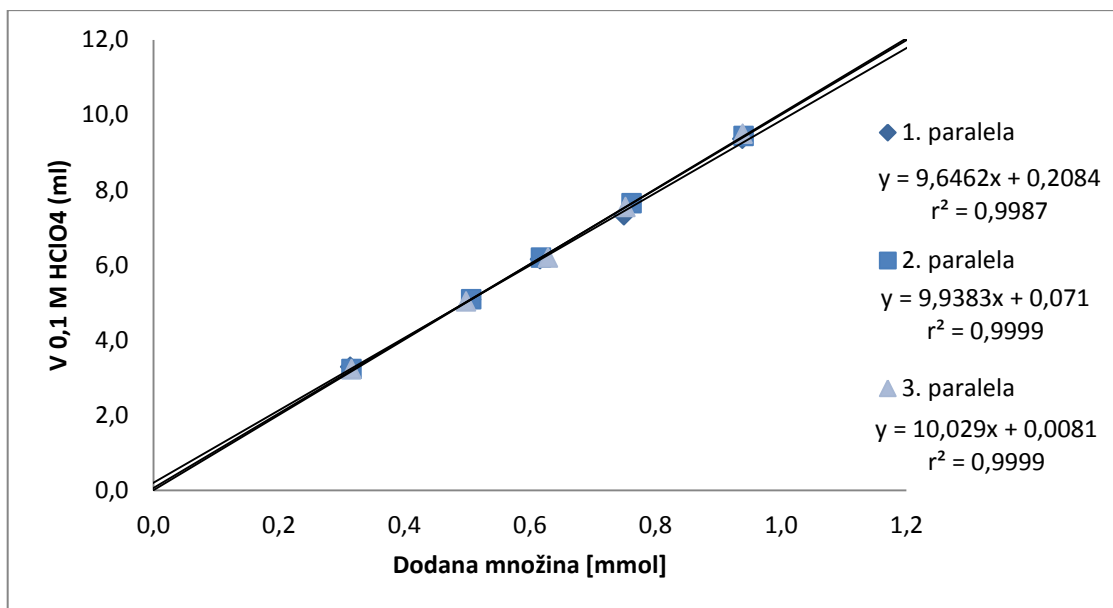
Preglednica XXIX: Rezultati ugotavljanja linearnosti titracijske metode za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida.

Koncentracija vzorca* [%]	Masa vzorca [mg]	Volumen 0,1 M HClO ₄ [mL]	Dodana množina [mmol]
1. Paralelka			
50	55,11	3,285283	0,313635
81	88,98	5,074380	0,506392
98	108,27	6,149011	0,616173
120	131,74	7,318545	0,749742
150	164,93	9,355080	0,938629
2. Paralelka			
50	55,46	3,229561	0,315627
81	89,00	5,084287	0,506506
99	108,51	6,196112	0,617539
122	133,94	7,642098	0,762263
150	165,25	9,432762	0,940450
3. Paralelka			
50	55,43	3,223481	0,315456
80	87,53	5,02462	0,498140
100	110,53	6,190189	0,629035
120	132,15	7,538873	0,752076
150	165,04	9,493494	0,939255

* Glede na predpisano koncentracijo vzorca v farmakopeji ($c = 2,00 \text{ mg/mL}$).

Preglednica XXX: Rezultati izračuna regresijske premice za titracijsko metodo za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida.

Statistika			
Paralelka	1	2	3
r	0,9994	1,0000	0,9995
% odseka na y osi (glede na 100 % konc. vzorca)	3,31	1,13	0,13
Naklon	9,6462	9,9383	10,0290
Odsek na y osi	0,2084	0,0710	0,0081



Slika 15: Regresijske premice vseh treh paralelk določanja vsebnosti tiaminijevega klorida s titracijsko metodo.

Na sliki 15 so prikazane regresijske premice za vse 3 paralelke, določene s titracijsko metodo. Iz preglednice XXX in slike 15 je razvidno, da so vse tri krivulje linearne, r je namreč povsod $\geq 0,998$. Tudi odstotek odseka na y osi glede na 100 % konc. vzorca je pri vseh premicah ustrezen, znaša namreč 3,31 % za 1. paralelko, 1,13 % za drugo in 0,13 % za tretjo, kar pa je znotraj validacijskega kriterija v preglednici VI. Titracijska metoda za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida je torej linearna v območju 50 % – 150 % (tj. 1,00 mg/mL – 3,00 mg/mL).

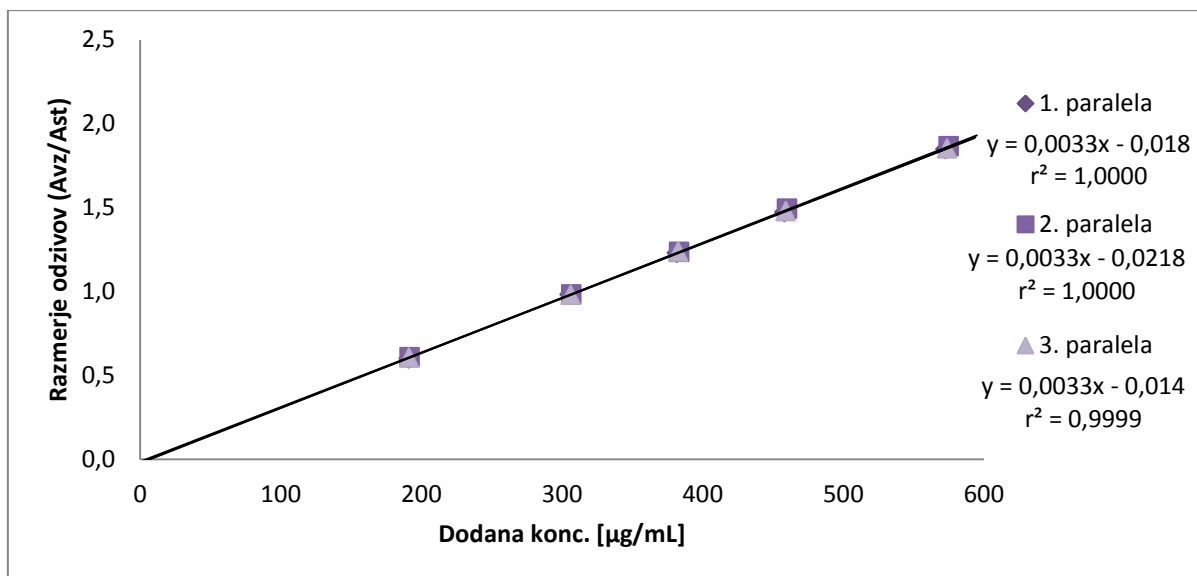
Preglednica XXXI: Rezultati ugotavljanja linearnosti HPLC metode za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida.

Koncentracija standarda* [%]	Redčenje	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{IS})	Dodana konc. [$\mu\text{g/mL}$]
1. Paralelka			
49,82	750	0,601265	190,9102
79,71	468,75	0,981084	305,4564
99,64	375	1,229492	381,8205
119,57	312,5	1,472354	458,1846
149,46	250	1,848385	572,7307
2. Paralelka			
50,02	750	0,608951	191,6639
80,03	468,75	0,981788	306,6622
100,03	375	1,234963	383,3277
120,04	312,5	1,493373	459,9933
150,05	250	1,864051	574,9916
3. Paralelka			
49,93	750	0,606355	191,3190
79,88	468,75	0,980701	306,1104
99,85	375	1,236577	382,6380
119,82	312,5	1,478349	459,1656
149,78	250	1,851097	573,9570

* Glede na predpisano koncentracijo v farmakopeji ($c = 0,40 \text{ mg/mL}$).

Preglednica XXXII: Rezultati izračuna regresijske premice za HPLC metodo za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida.

Statistika			
Paralelka	1	2	3
r	1,0000	1,0000	0,9999
% odseka na y osi glede na 100 % konc. standarda	- 1,45	- 1,75	- 1,13
Naklon	0,0033	0,0033	0,0033
Odsek na y osi	- 0,0180	- 0,0218	- 0,0140



Slika 16: Regresijske premice vseh treh paralelk določanja vsebnosti tiaminijevega klorida s HPLC metodo.

Slika 16 prikazuje regresijske premice treh paralelk, določene s HPLC metodo. Kot merilo linearnosti smo tudi tukaj izračunali r , ki pa je med premicami skoraj enak. Vse 3 premice so torej linearne ($r \geq 0,998$), kar potrjujejo tudi ustrezne vrednosti odseka na y osi glede na 100 % koncentracijo standarda.

Zaključimo lahko, da sta obe metodi za določanje tiaminijevega klorida linearni v območju 50 – 150 % ciljne koncentracije analita (tj. 1,00 mg/mL – 3,00 mg/mL (titracija) oz. 0,2 mg/mL – 0,6 mg/mL (HPLC)). Iz velikosti odseka od y osi (odstotek odstopanja) je razvidno, da so pri HPLC metodi premice nekoliko bolj ponovljive (r je med paralelkami skoraj enak), medtem ko so pri titracijski metodi odstopanja večja. Glede na to, da smo nekatere raztopine (80 %, 100 % in 120 % koncentracija analita) uporabili iste kot pri točnosti metode, je tudi tukaj vzrok za visoko sipanje rezultatov verjetno v analitski napaki. Vseeno pa lahko sklepamo, da je v tem primeru HPLC metoda nekoliko boljša oz. bolj linearna od titracije.

4.2.5 ROBUSTNOST METODE (STABILNOST RAZTOPIN VZORCEV IN STANDARDOV)

Z namenom ugotovitve robustnosti metode smo tudi pri tem analitu spremljali stabilnost raztopin standardov in vzorcev. Raztopinam smo najprej določili vsebnost takoj po pripravi oz. ob času 0 h, nato pa še po 0 – 3 h (titracija) oz. po 24 h (HPLC). Rezultati so prikazani

v preglednicah XXXIII-XXXV. Vrednosti ob času 0 h pri HPLC metodi smo uporabili tudi za določanje natančnosti HPLC metode znotraj enega dneva (preglednica XXVI).

Preglednica XXXIII: Stabilnost raztopin vzorcev tiaminijevega klorida, določenih s titracijsko metodo; T pomeni temperatura.

Paralelka	Pogoj shranjevanja	VSEBNOST [%] (na snov kot je)	Sprememba vsebnosti glede na 0 h [%]
1	Sobna T, 0 h	96,20	/
Stabilnost 1 h			
2	Sobna T/svetloba, 1 h	97,28	1,1
3	Sobna T/tema, 1 h	94,86	1,4
Stabilnost 2 h			
4	Sobna T/svetloba, 2 h	95,20	1,0
5	Sobna T/tema, 2 h	94,46	1,8
Stabilnost 3 h			
6	Sobna T/svetloba, 3 h	94,77	1,5
7	Sobna T/tema, 3 h	93,48	- 2,8
Stabilnost 0,5 h			
/	Sobna T, 0 h	95,08	/
8	Sobna T/svetloba, 0,5 h	95,02	0,1
9	Sobna T/tema, 0,5 h	94,62	- 0,5

Preglednica XXXIII prikazuje rezultate vsebnosti tiaminijevega klorida v raztopini vzorcev, določenih po 0 h, 1 h, 2 h, 3 h in 30 min po pripravi. Raztopine smo v tem času shranjevali na svetlobi oz. v temi, pri sobni temperaturi. Iz relativnih sprememb vsebnosti glede na 0 h je razvidno, da validacijskemu kriteriju za robustnost metode ($\Delta \leq 0,5 \%$) ustrezata samo paralelki 8 in 9. Po preračunu na brezvodno snov (*enačba 20*) so nekatere vrednosti (paralelka 2 in 7) celo izven specifikacijskih mej za vsebnost piridoksinijevega klorida po PhEur metodi. Navedeni pogoji torej niso primerni oz. so raztopine vzorcev pripravljene po tej metodi stabilne največ 30 min po pripravi, ne glede na to, ali jih shranjujemo na svetlobi ali v temi. Zaključimo lahko, da je pri tej metodi potrebna oz. priporočljiva sprotna priprava vzorcev. Takšne rezultate smo tudi pričakovali, saj že v farmakopejskem predpisu piše, da je raztopino vzorca treba titrirati takoj po pripravi, naši dobljeni rezultati pa to tudi potrjujejo.

Preglednica XXXIV: Stabilnost raztopin vzorcev tiaminijevega klorida, določenih s HPLC metodo.

VSEBNOST VZORCEV (na snov kot je) [%]				
Paralelka	Sobna T/svetloba		Vzorčevalnik (22 °C)/tema	
	0 h [%]	24 h [%]	0 h [%]	24 h [%]
1	94,40	95,05	94,18	94,20
2	94,01	94,93	94,17	94,75
3	94,14	94,52	94,61	95,16
Povprečje (n = 3)	94,18	94,83	94,32	94,70
SD (n = 3)	0,20	0,28	0,25	0,48
RSD (n = 3)	0,21	0,29	0,27	0,51
Relativna razlika [%]	0,7		0,4	
Absolutna razlika [%]	0,65		0,38	
Povprečje (n = 6) [%]	94,51		94,51	
SD [%]	0,42		0,40	
RSD [%]	0,44		0,43	
95 % interval zaupanja [%]	93,44 – 95,58		93,48 – 95,55	

V preglednici XXXIV so prikazani rezultati stabilnosti raztopin vzorcev tiaminijevega klorida v 3 paralelkah ob času 0 h (takoj po pripravi) in po 24 h. Raztopine smo shranjevali na svetlobi pri sobni temperaturi in v avtomatskem vzorčevalniku pri 22 °C, v temi. Prikazano je povprečje rezultatov 3 paralelk pri posameznem pogoju, RSD in relativna razlika med 0 h in 24 h pri določenem pogoju. V kolikor rezultate preračunamo na brezvodno snov (*enačba 20*), ugotovimo, da so vse vrednosti znotraj specifikacijskih mej po USP metodi. Relativna sprememba povprečne vsebnosti glede na čas 0 h pri vzorcih, ki smo jih shranjevali na svetlobi, znaša 0,7 % pri vzorcih, shranjenih v avtomatskem vzorčevalniku pa 0,4 %. Oba rezultata sta manjša od $\pm 1,0$ % (glede na 0 h) in zato ustrezata kriteriju za robustnost metode. Tudi RSD meritev pri posameznem pogoju shranjevanja je ustrezen, tako kot to zahteva validacijski kriterij v preglednici IX. HPLC metoda je torej robustna, oz. raztopine vzorcev pripravljene po tej metodi so stabilne tudi po 24 h shranjevanja na svetlobi ali v temi.

Preglednica XXXV: Stabilnost standardnih raztopin tiaminijevega klorida, določenih s HPLC metodo.

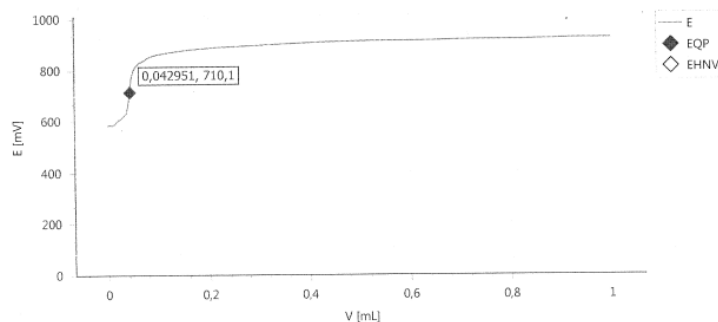
Stabilnost standardnih raztopin po 24 h, 22 °C, vzorčevalnik, tema						
čas	Standard 1		Standard 2		Standard 3	
	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]
0 h	1,242380	-	1,234963	-	1,236577	-
24 h	1,239489	- 0,2	1,239186	0,3	1,23752	0,1
Povprečje rel. razlika, 24 h [%]	0,1					
Stabilnost standardnih raztopin po 24 h, sobna T, svetloba						
čas	Standard 1		Standard 2		Standard 3	
	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]	Razmerje odzivov (A_{vz}/A_{is})	Relativna razlika [%]
0 h	1,24238	-	1,234963	-	1,236577	-
24 h	1,24260	0,0	1,246876	1,0	1,242659	0,5
Povprečje rel. razlika, 24 h [%]	0,5					

Poleg raztopin vzorcev smo pri HPLC metodi analizirali tudi standardne raztopine. Pripravili smo jih v treh paralelkah, in jih 24 h shranjevali na svetlobi (pri sobni temperaturi) oz. v temi (v avtomatskem vzorčevalniku pri 22 °C). Rezultati po 0 h in 24 h so prikazani v preglednici XXXV. Glede na validacijski kriterij za stabilnost raztopin standardov (preglednica IX) so vse posamezne in povprečne spremembe odzivov glede na čas 0 h pri danih pogojih manjše od $\pm 1,0$ %. Zaključimo lahko, da so raztopine standardov pripravljene po tej metodi stabilne tudi po 24 h shranjevanja na svetlobi in v temi.

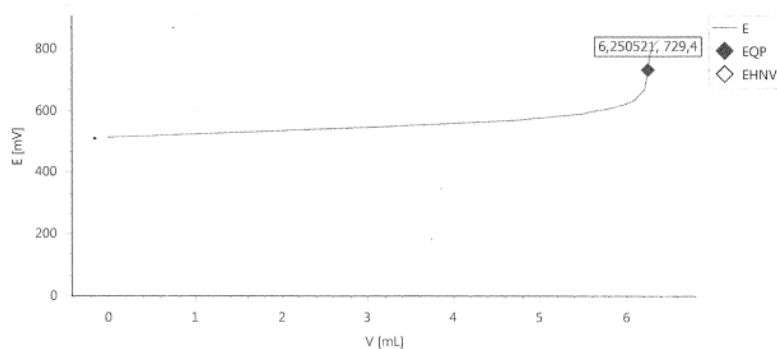
4.2.6 SELEKTIVNOST/ SPECIFIČNOST METODE

Podobno kot pri piridoksinijevemu kloridu smo tudi pri tiaminijevemu kloridu za prikaz specifičnosti metode pri titracijski metodi uporabili titracijsko krivuljo slepe raztopine (slika 17) in raztopine vzorca (slika 18).

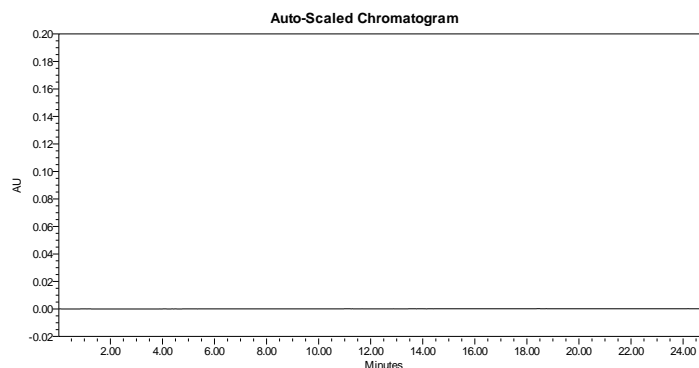
Kromatogrami topila (slika 19), standardne raztopine (slika 20) in raztopine vzorcatiaminijevega klorida (slika 21) so prikazani kot rezultat selektivnosti HPLC metode. Retencijski časi ustrezajo farmakopejskim predpisom (približno 12 min za vrh tiaminijevega klorida).



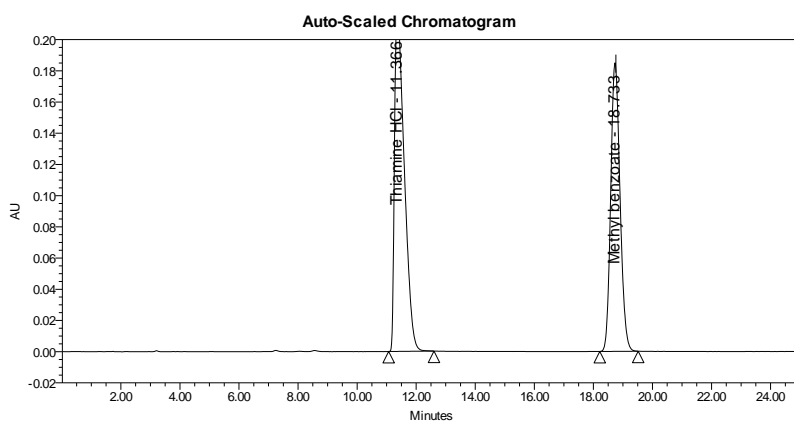
Slika 17: Krivulja slepe raztopine določena z metodo titracije za določitev vsebnosti tiaminijevega klorida.



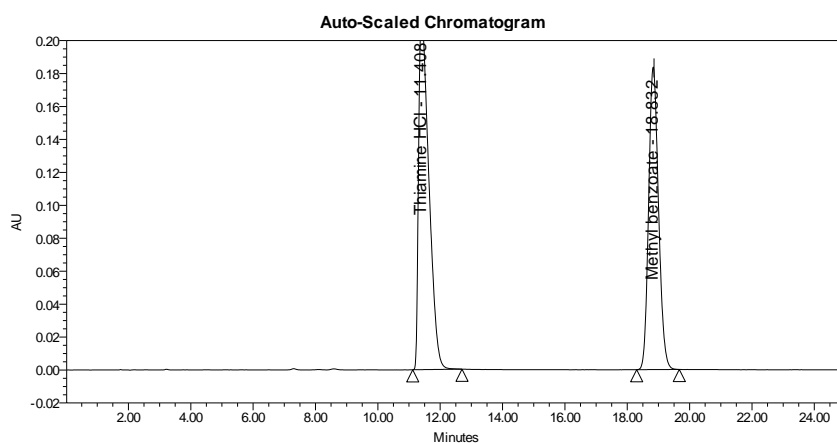
Slika 18: Krivulja raztopine vzorca določena z metodo titracije za določitev vsebnosti tiaminijevega klorida.



Slika 19: Kromatogram topila pri HPLC metodi za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida.



Slika 20: Kromatogram standardne raztopine pri HPLC metodi za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida. Prvi vrh prikazuje iskani analit (tiaminijev klorid), drugi vrh pa je interni standard (metil benzoat).



Slika 21: Kromatogram raztopine vzorca pri HPLC metodi za določanje vsebnosti tiaminijevega klorida. Prvi vrh prikazuje iskani analit (tiaminijev klorid), drugi vrh pa je interni standard (metil benzoat).

Tudi tukaj so ugotovitve enake kot pri selektivnosti piridoksinijevega klorida (4.1.6). Zaključimo lahko, da je HPLC metoda bolj selektivna od titracijske metode.

5 SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo izvedli primerjavo dveh metod za določanje vsebnosti vitaminov - primerjavo titracije in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Primerjavo smo izvedli na vitaminih piridoksinijev klorid (vitamin B6) in tiaminijev klorid (vitamin B1). Pri obeh vitaminih smo izhajali iz farmakopejskih metod (PhEur in USP) za določanje vsebnosti, ki smo jih tudi validirali. Po PhEur je pri obeh analitih za določanje vsebnosti predpisana titracija, medtem ko je pri USP to HPLC metoda. V okviru validacije smo pri obeh metodah analizirali parametre natančnost metode znotraj enega dneva, linearnost in točnost metode, robustnost metode (oz. stabilnost raztopin vzorcev in standardov) in selektivnost/specifičnost metode. Na osnovi teh parametrov smo metodi tudi medsebojno primerjali.

Pri obeh analitih sta predpisani titracijski metodi zelo podobni. Priprava raztopin vzorcev je namreč praktično enaka, razlikuje se le zatehta vzorca. Ugotovili smo, da sta obe titracijski metodi natančni, točni (v območju 80 % – 120 % ciljne koncentracije analita), linearni (50 % – 150 % ciljne koncentracije analita) in specifični le za podani analit. Pri obeh metodah se je izkazalo, da so raztopine vzorcev stabilne največ 30 minut po pripravi, zato je treba raztopine vzorcev pripravljati tik pred titracijo.

Po USP je za določanje vsebnosti obeh vitaminov predpisana metoda HPLC. Metodi nista povsem enaki, vseeno pa imata skupno to, da se v obeh primerih uporablja interni standard in izokratska elucija. Ugotovili smo, da sta obe metodi natančni, točni (v območju 80 % – 120 % ciljne koncentracije analita), linearni (50 % – 150 % ciljne koncentracije analita) in selektivni. Pripravljene raztopine vzorcev in standardov so pri obeh HPLC metodah stabilne tudi po 24 h shranjevanja v temi ali na svetlobi.

Vse štiri analitske metode so torej natančne, točne v območju 80 % – 120 % ciljne koncentracije analita in linearne v območju 50 % – 150 % ciljne koncentracije analita. Pri obeh vitaminih smo ugotovili, da je metoda HPLC bolj selektivna od titracije, kar smo tudi pričakovali. Z njo namreč lahko poleg preiskovanega analita določimo še ostale primesi (npr. nečistote) v vzorcu, kar pa s titracijo ne moremo. HPLC metoda je v primerjavi s titracijo boljša za napovedovanje stabilnosti vzorcev, ravno zaradi boljše selektivnosti. Potencialne nečistote, ki nastanejo med staranjem vzorca, bi lažje zaznali in jih ločili od glavne komponente s HPLC metodo.

V splošnem so rezultati med posameznima analitskima metodama za vsak vitamin primerljivi, zato lahko zaključimo, da sta obe analitski metodi (tj. titracija in HPLC) primerni oz. ustrezni za določanje vsebnosti piridoksinijevega klorida in tiaminijevega klorida. Majhne razlike med posameznima analitskima metodama so posledica analitskih napak oz. same analitske variabilnosti. Kljub temu so te razlike zelo zanemarljive, zato se iz pridobljenih rezultatov tudi težko odločimo, katera analitska metoda je »boljša«.

Titracija je časovno hitrejša metoda in ekonomsko bolj dostopna oz. cenejša, vendar pa je ta metoda zgolj kvantitativna, saj pri njej nimamo dejanskega pogleda v to, kaj titriramo. V nasprotju s titracijo je HPLC metoda bistveno bolj selektivna in tako primerna za kvalitativno in kvantitativno analizo (še posebej za analizo vzorcev, v katerih je več komponent), njena slabost pa je v visoki ceni inštrumenta in vseh kemikalij ter pripomočkov (standardi, kolone ...). HPLC analiza je običajno časovno bolj zamudna in zahtevna za izvedbo, rezultati pa so odvisni tudi od kvalitete uporabljenih standardov.

V kolikor se osredotočimo na industrijsko uporabo, sta pomembni tako cena kot tudi kakovostni in zanesljivi rezultati. S tega vidika bi bilo najbolje uporabiti kombinacijo obeh metod. Vendar pa, ker obe metodi dajeta primerljive rezultate in tako ustrezata svojemu namenu, bi bilo v prihodnosti za določevanje vsebnosti vitaminov bolj smiselno uporabljati titracijo, zaradi hitrejše, enostavnejše, predvsem pa cenejše izvedbe analize.

6 LITERATURA

- 1) Wei X, Qi L, Qiao J, Yao C, Wang F, Chen Y: Assay of vitamin B in urine by capillary electrochromatography with methacrylate-based monolithic column. *Electrophoresis* 2010; 31 (19): 3227–3232.
- 2) García L, Blázquez S, San Andrés MP, Vera S: Determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in pharmaceuticals by synchronous fluorescence spectrometry in organized media. *Anal. Chim. Acta* 2001; 434 (2): 193–199.
- 3) Marks J: *The vitamins: their role in medical practice*, 1st edition, MTP Press, Hingham, 1985: 143–155.
- 4) Marks J: *A guide to the vitamins: their role in health and disease*, 1st edition, MTP, Lancaster, 1975: 73–83.
- 5) Preedly VR, Rajendram R, Martin CR: *Metabolism and Pathophysiology of Bariatric Surgery*, 1st edition, Academic press, London, 2016: 479–489.
- 6) <http://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/vitamini/147-tiamin-vitamin-b1.html>
(dostopano: september 2018)
- 7) <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB6-HealthProfessional/>
(dostopano: september 2018)
- 8) Bisp MR, Bor MV, Heinsvig EM, Kall MA, Nexø E: Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in plasma: Development and evaluation of a high-performance liquid chromatographic assay. *Anal. Biochem.* 2002; 305 (1): 82–89.
- 9) Misiuk W: The role of assay methods in characterizing the quality of bulk pharmaceuticals. *J. Pharm. Bioallied* 2010; 2 (2): 88–92.
- 10) <https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski#>
(dostopano: september 2018)
- 11) <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/2998/analysing-the-monographs/> (dostopano: november 2018)
- 12) Žorž M: *HPLC, Samozaložba, Ljubljana*, 1991: 5, 140–144.
- 13) Robards K, Haddad PR, Jackson PE: *Principles and practice of modern chromatographic methods*, 1st edition (reprinted), Elsevier academic press, London, 2004: 1–29.
- 14) Kazakevich Y, LoBrutto R: *HPLC for pharmaceutical scientists*, 1st edition, Wiley, Hoboken, 2007: 3–25.

- 15) https://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography
(dostopano: september 2018)
- 16) http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/Waters_HPLCSystem.gif
(dostopano: september 2018)
- 17) Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K: Introduction to pharmaceutical chemical analysis, 1st edition, Wiley, Chichester, 2012: 65–82, 89–102 in 173-190.
- 18) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 6th edition, Thomson learning, Belmont: 2007.
- 19) http://www.expertsmind.com/CMSImages/2237_Typical%20chromatogram.png
(dostopano: september 2018)
- 20) IUPAC: Nomenclature for chromatography. Pure & Appl. Chem. 1993; 65 (4): 819–872.
- 21) European pharmacopoeia, 9th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- 22) Gorenc D, Gorenc B, Gomišček S: Analizna kemija. Gravimetrična in volumetrična analiza, 6. izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1991.
- 23) https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/analizna2_gradivo.pdf
(dostopano: september 2018)
- 24) Paithankar VH: HPLC method validation for pharmaceutical: a review. Int. J. Univers. Pharm. Bio. Sci. 2013; 2 (4): 229–240.
- 25) [http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).PDF](http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF)
(dostopano: september 2018)
- 26) European pharmacopoeia, 9th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2017: 3451–3452 in 3756–3757.
- 27) United States pharmacopoeia, USP 40-NF 35, United States Pharmacopoeial Convention, Twinbrook Parkway, Rockville, 2016: 5924–5025 in 6430–6431.