

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA HAJNRIH

**VALIDACIJA HPLC METODE ZA UGOTAVLJANJE
VSEBNOSTI SESKVITERPENSKIH KISLIN V
IZVLEČKIH BALDRIJANA (*Valeriana officinalis*) IN
NJENA UPORABA PRI POSPEŠENI STABILNOSTNI
ŠTUDIJI**

**VALIDATION OF HPLC METHOD FOR THE
DETERMINATION OF ASSAY OF SESQUITERPENIC
ACIDS IN EXTRACTS OF VALERIANA
(*Valeriana officinalis*) AND ITS USE IN ACCELERATED
STABILITY STUDY**

Ljubljana, 2009



Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo in v Javnem zavodu Mariborske lekarnе Maribor pod mentorstvom izr. prof. dr. Samota Krefta.

Zahvala

Dr. Alešu Mlinariču se zahvaljujem za priložnost opravljanja eksperimentalnega dela diplomske naloge v Javnem zavodu Mariborske lekarnе Maribor in za dodelitev teme diplomske naloge.

Hvala mentorju izr. prof. dr. Samu Kreftu za nasvete med izvajanjem laboratorijskega dela, za kritično branje in koristne napotke za izboljšanje vsebine diplomske naloge.

Iskreno hvala delovnemu mentorju Juretu Zakrajšku, mag. farm., za usmerjanje in pomoč med laboratorijskim delom, za odgovarjanje na številna vprašanja in za nasvete pri pisanju diplomske naloge ter kritičen pregled le-te.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem tudi zaposlenim v Kontrolno–analiznem laboratoriju Javnega zavoda Mariborskih lekarn Maribor.

Za kritično branje diplomske naloge hvala prof. dr. Albinu Kristlu in izr. prof. dr. Vojku Kmetcu.

Posebno pa se zahvaljujem svojim staršem, bratu, starim staršem in kolegom s fakultete za moralno podporo med študijem in nastajanjem diplomskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Samota Krefta.

Ljubljana, november 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec



VSEBINA

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD.....	1
1.1 Baldrijan ali zdravilna špajka (<i>Valeriana officinalis</i>).....	1
1.1.1 Sistematika	1
1.1.2 Botanični opis	1
1.1.3 Rastišče.....	2
1.2 Droga	3
1.2.1 Kemizem.....	3
1.2.2 Farmakologija droge.....	5
1.2.3 Uporaba	6
1.2.4 Analitika droge	7
1.3 Kromatografija.....	7
1.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	8
1.4 Validacija	12
1.4.1 Meja zaznavnosti	13
1.4.2 Meja določljivosti	13
1.4.3 Selektivnost / specifičnost	13
1.4.4 Linearnost	14
1.4.5 Natančnost	14
1.4.6 Točnost	15
1.4.7 Delovno območje metode.....	15
1.4.8 Robustnost	16
1.5 Preizkus ustreznosti sistema	16
2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	17



3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	Reagenti, topila in oprema	18
3.1.1	Standardi	18
3.1.2	Vzorci	18
3.1.3	Kemikalije	19
3.1.4	Aparature in oprema	19
3.2	Metode dela	20
3.2.1	Priprava raztopin vzorcev	20
3.2.2	Priprava standardnih raztopin	21
3.2.3	Priprava mobilne faze po Ph. Eur. 5	21
3.2.4	Parametri analize s HPLC	23
3.2.5	Stabilnost standardov	24
3.2.6	Validacija HPLC metode za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskikh kislin	24
3.2.7	Pospešena stabilnostna študija	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1	Preizkus ustreznosti sistema	33
4.2	Stabilnost standardnih raztopin	33
4.3	Validacija izbrane HPLC metode	35
4.3.1	Meja zaznavnosti	35
4.3.2	Meja določljivosti	36
4.3.3	Specifičnost	37
4.3.4	Selektivnost	39
4.3.5	Linearnost	44
4.3.6	Natančnost	45
4.3.7	Točnost	47
4.3.8	Delovno območje	48
4.3.9	Robustnost	48



4.4	Pospešena stabilnostna študija	52
5	SKLEP	54
6	LITERATURA	55



POVZETEK

Kakovost droge korenine baldrijana preverjamo z ugotavljanjem vsebnosti seskviterpenskimi kislin, za kar peta in šesta izdaja Evropske farmakopeje (Ph. Eur.) predpisujeta metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) z uporabo dantrona (Ph. Eur. 5) ali valerenske kisline (Ph. Eur. 6) kot standarda.

Izvedba metode se od laboratorija do laboratorija lahko rahlo razlikuje, predvsem zaradi različnih pristopov analitikov, uporabe različnih aparatov in materialov ter različnega okolja v laboratoriju. Zato smo za namene ugotavljanja vsebnosti seskviterpenskimi kislin v izvlečkih baldrijana v Kontrolno–analiznem laboratoriju Javnega zavoda Mariborskih lekarn Maribor izvedli validacijo izbrane farmakopejske metode po Ph. Eur. 5. Po peti izdaji Evropske farmakopeje smo delali zaradi ekonomskih razlogov, saj je cena dantrona občutno nižja kot cena standarda valerenske kisline, kar je pomembno dejstvo za podjetje. Šesto izdajo Evropske farmakopeje smo uporabili le za pripravo vzorca tinkture Mirin baldrijanove kapljice, saj v peti izdaji ni monografije o baldrijanovi tinkturi. Pri analizi prej omenjenega izdelka smo nato kot standard uporabili dantron ter vsebnost seskviterpenskimi kislin izračunali po enačbi iz Ph. Eur. 5.

Validirali smo specifičnost, selektivnost, linearnost, točnost, natančnost in delovno območje. Mejo zaznavnosti, mejo določljivosti in robustnost pa smo določili za namene nadaljnjega raziskovalnega dela na izbrani aparaturi. Vrednosti vseh parametrov validacije so znotraj kriterijev, zastavljenih pred analizo. Preizkus robustnosti je pokazal, da je potrebno med izvedbo metode zagotavljati v farmakopeji predpisano valovno dolžino in pretok ter uporabljati kolone določenega proizvajalca.

Preverili smo tudi znotraj in med dnevno stabilnost pripravljene standardne raztopine dantrona in opravili štiri tedensko pospešeno stabilnostno študijo na dveh izdelkih Javnega zavoda Mariborskih lekarn, ki vsebujeta obravnavano drogo. Vsebnost snovi v vseh preizkušanih raztopinah med potekom testiranja ni pomembno nihala in je bila vseskozi znotraj predpisanih intervalov. Vsebnost seskviterpenskimi kislin v tinkturi Mirin baldrijanove kapljice je 0,019%, v pripravku Mirin baldrijanove kapljice forte, ki je pripravljen po E/S/C/O/P monografiji, pa 0,17%. Tinktura tako ustreza predpisu v Ph. Eur. 6, pri Mirin baldrijanovih kapljicah forte pa lahko potrdimo, da je suhi ekstrakt, uporabljen za njihovo izdelavo, pridobljen iz droge, ki ustreza predpisu v Ph. Eur. 5.



SEZNAM OKRAJŠAV

Ac	acetil
AcOiVal	β -acetoksiizovaleril ali 3-(acetiloksi)-3-metilbutanoil
AUC	površina pod krivuljo – area under curve
AVA	acetoksivalerenska kislina – acetoxyvalerenic acid
DAD	detektor na niz diod – diode array detektor
GABA	γ – aminobutanojska kislina – γ – aminobutyric acid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – high performance liquid chromatography
ICH	mednarodna konferenca o harmonizaciji – international conference on harmonisation
iVal	izovaleril ali 3-metilbutanoil
LOD	meja zaznavnosti – limit of detection
LOQ	meja določljivosti – limit of quantification
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
NOR	normiran
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja – Pharmacopoeia Europea
PPI	indeks čistote vrha – peak purity index
RSD	relativni standardni odklon – relative standard deviation
RSE	relativna standardna napaka – relative standard error
SA	Sigma-Aldrich
SD	standardni odklon – standard deviation
SF	stacionarna faza
SK	seskviterpenske kisline – sesquiterpenic acids
STD	standard
t_r	retencijski čas – retention time
UV-VIS	ultravijolično – vidno
VA	valerenska kislina – valerenic acid
VZ	vzorec

1 UVOD

1.1 Baldrijan ali zdravilna špajka (*Valeriana officinalis*)

1.1.1 Sistematika

Baldrijan spada v družino špajkovk (*Valerianaceae*), ki so zelišča severne poloble. V to družino spadajo enoletnice ali zelnate trajnice. *Valeriana officinalis* oziroma baldrijan iz rodu *Valeriana* je najbolj znana vrsta te družine. V ta rod spada več kot 250 vrst s številnimi podvrstami. Drug znan predstavnik te družine je motovilec, ki spada v rod *Valerianella* (1, 2).

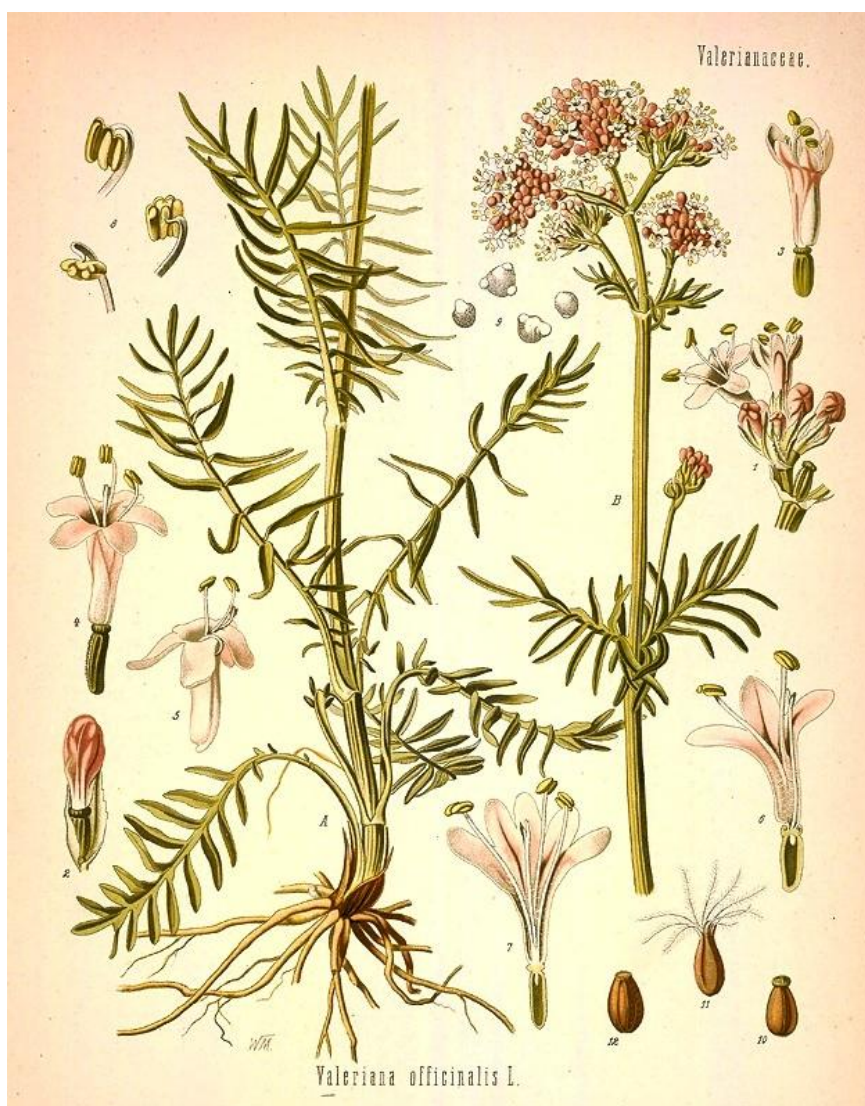
1.1.2 Botanični opis

Baldrijan (slika 1) je visoko trajno zelišče, ki ima navpično, kratko in mesnato korenino, iz katere vsako leto požene do dva metra visoko, pokončno, rahlo robato, okroglo, votlo in gladko steblo zelene do nekoliko rdečkaste barve. Steblo je proti vrhu razvejano in nosi socvetja. Listi so razdeljeni po parih vzdolž stebela, so nasprotni, neparno pernato deljeni, spodnji listi imajo dolge peclje, zgornji pa so sedeči. Listne reže na spodnji strani srednjih stebelnih listov so dolge 24 – 26 μm . Iz zalistja zgornjih listov poganjajo češuljasta socvetja z majhnimi belimi ali rožnatimi cvetovi. Cvet ima pet majhnih čašnih listov, petdelni cvetni venec je lijaste oblike in rahlo vrečast pri bazi. V cvetu ima tri prašnike in pestič, ki je sestavljen iz podrasle plodnice s tremi predali (enim plodnim in dvema jalovima ter zakrnelima), ene semenske zasnove in tridelne brazde. Plod je rožka podolgovate suličaste oblike, do 5 mm dolga, ki je lahko dlakava ali gladka (1, 4).

Rastline vrste *V. officinalis* so po ploidnosti zelo raznolike, od diploidnih do tetraploidnih ali oktaploidnih. Britanska *V. officinalis* je po navadi oktaploidna, medtem ko so rastline centralne Evrope tetraploidne (4).

1.1.3 Rastišče

Divje rastoče oblike baldrijana rastejo na vlažnih travnikih, nabrežjih rek in posekah od nižine do gorskega pasu v Evropi in severni Aziji. Kultivirane rastline za terapevtsko uporabo gojijo v Belgiji, Angliji, vzhodni Evropi, Franciji, Nemčiji, Nizozemski, Japonski, Rusiji in Združenih državah Amerike (3, 4, 5).



Slika 1: Baldrijan (*Valeriana officinalis*) (17).

V evropskem zdravstvu je uradna vrsta *V. officinalis*, ki ima tri podvrste: *ssp. officinalis*, *ssp. collina* in *ssp. sambucifolia*. Za terapevtske pripravke se uporabljajo tudi druge vrste, npr. *V. repens*, *V. edulis*, *V. coreana*, *V. amurensis*, *V. jatamansi*, *V. sithensis* ... (4).

1.2 Droga

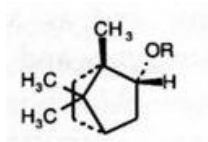
Kot droga se uporablja korenina s stranskimi koreninami in podzemnimi pritlikami, ki so ob nabiranju jeseni skoraj brez vonja. Po hitrem sušenju umite korenine z zrakom temperature 35 – 40 °C dobimo rahlo rjavo surovo drogo z blagim ostrim vonjem. Po nepravilnem sušenju lahko zaznamo tipičen vonj po izovalerianski kislini (nastane zaradi razpada bornil izovalerianata iz eteričnega olja) in spremembo barve, čemur se izognemo s predhodno stabilizacijo droge. Drogo moramo shranjevati zaščiteno pred vlago in svetlobo. Suha droga ima malce sladek, kasneje aromatičen in rahlo grenak okus. Dandanes jo pridobivajo iz dvoletnih gojenih rastlin, ki jih je za večjo vsebnost eteričnih olj najbolje posejati spomladi z raztresanjem semen in pobirati jeseni v jutranjih urah v hladnem vremenu. Tudi rezanje cvetočih vrhov preden rastlina razvije semena naj bi povzročilo boljši razvoj korenine (3, 4).

Droga *Valerianae radix* je opisana v monografiji Evropske farmakopeje.

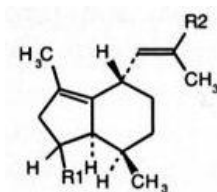
1.2.1 Kemizem

Korenina baldrijana vsebuje naslednje skupine farmakološko učinkovitih spojin:

- * **ETERIČNO OLJE** je zelo spremenljive vsebnosti (večina farmakopej predpisuje najmanj 0,5% EO na težo suhe droge) in sestave, saj lahko vsebuje več kot 150 spojin. Sestavljajo ga mono- in seskviterpenski ogljikovodiki, katerih glavni predstavniki so bornil acetat, bornil izovalerianat, valerenska kislina (VA), acetoksivalerenska kislina (AVA), valerianol, valeranon, kriptofavronol in valerenal (slika 2). Druge sestavine eteričnega olja so še izoborneol, borneol, terpinolen, α -pinen, kamfen, β -pinen, limonen in drugi.



bornil acetat R = Ac
bornil izovalerat R = iVal



	R ₁	R ₂
valerenal	H	CHO
valerenska kislina	H	COOH
acetoksivalerenska kislina	OAc	COOH
hidroksivalerenska kislina	OH	COOH

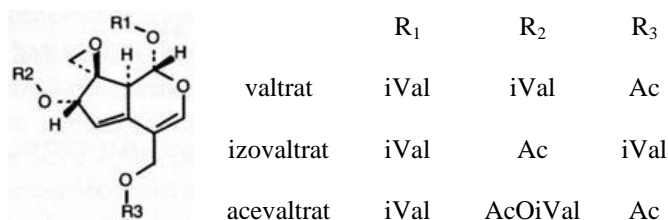
Slika 2: Strukture primarnih komponent eteričnega olja korenine baldrijana.

Seskviterpenske kisline (valerenska, acetoksivalerenska in hidroksivalerenska kislina) so značilne za *V. officinalis* in njene podvrste, najdemo pa jih tudi v drugih vrstah.

Hkratna prisotnost valerenala, valerenske in acetoksivalerenske kisline je značilna le za vrsto *V. officinalis*, s čimer lahko to vrsto ločimo od vrst *V. wallichii* in *V. edulis* (4).

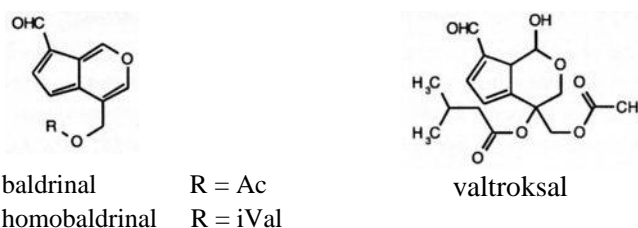
* **EPOKSI IRIDOIDNI ESTRI (VALEPOTRIATI – VALeriane EPOksi TRIestri)**

so nehlapni triestri terpenoidnega alkohola, ki se nahajajo samo v podzemnih delih rastline in niso topni v vodi. Glavna predstavnika sta valtrat in izovaltrat, ki predstavljata 80 – 90% celotnih valepotriatov, kamor spadajo še acevaltrat, didrovaltrat in izovaleroksihidroksididrovaltrat (slika 3).



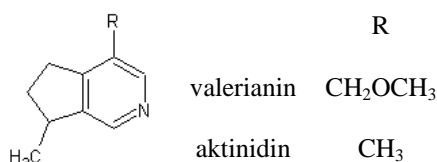
Slika 3: Strukture valepotriatov.

Zaradi njihove epoksidne strukture so zelo nestabilni in hitro razpadajo, predvsem v kisljih raztopinah. Zato je potrebno drogo previdno sušiti, s čimer dosežemo vsebnost valepotriatov najmanj 0,8%. V večini evropske droge je njihova povprečna vsebnost med 0,4 – 0,6%. Njihovi glavni razpadni produkti so baldrinal, homobaldrinal in valtroksal, katerih formule so prikazane na sliki 4 (4, 5).



Slika 4: Strukture razpadnih produktov valepotriatov.

* **ALKALOIDI** – v posušeni drogi naj bi jih bilo 0,05 – 0,1%. Predstavniki so valerianin, valerin, aktinidin in pinoresinol (slika 5).



Slika 5: Strukture alkaloidov v baldrijanu.

V korenini baldrijana najdemo v majhnih količinah tudi čreslovine, škrob, sladkor, fenolne kisline (klorogensko in kavno kislino), aminokisline (arginin, GABA, glutamin, tirozin), flavonoide, holin, β -sitosterol, maščobne kisline in razne minerale (4, 5).

1.2.2 Farmakologija droge

Učinkovine korenine baldrijana v glavnem delujejo **sedativno** in **spazmolitično**.

Sedativno delovanje baldrijana naj bi bilo glede na *in vitro* študije posledica vezave komponent ekstrakta na receptorje γ -aminobutanojske kisline (GABA) in na adenozijske, barbituratne ter benzodiazepinske receptorje. Hkrati naj bi vodni ekstrakti inhibirali privzem in stimulirali sproščanje GABA in tako okrepili njene biokemične in vedenjske učinke. Slednje bi lahko povečala tudi GABA, ki jo normalno vsebuje ekstrakt. *In vivo* študije nakazujejo, da bi lahko bila za sedativno delovanje korenine baldrijana odgovorna visoka koncentracija glutamina v ekstraktu. Glutamin je namreč sposoben prehajati hemoencefalno bariero, v možganih pa se metabolizira do GABA (5).

Tudi valepotriati in njihovi razpadni produkti, npr. baldrinal, bi lahko bili odgovorni za sedativno delovanje droge, vendar pa so oboji zelo neobstojni in jih v tržnih izdelkih skoraj ni. Druge možne aktivne komponente so alkaloidi, predvsem je aktualen 1-hidroksipinoresinol, ki kaže afiniteto do serotoninskih 5-HT_{1A} receptorjev, vendar bo za potrditev tega potrebno izvesti še nadaljnje študije (4, 5).

Kljub vsem opravljenim študijam pa še vedno ni znano ali sedativno delovanje droge korenine baldrijana temelji na eni komponenti, skupini komponent, drugih neznanih komponentah ali pa droga tako deluje zaradi sinergističnega delovanja vseh komponent (5).

Spazmolitično delovanje v glavnem povzročata valtrat in dihidrovaltrat, ki delujeta na centre v centralnem živčnem sistemu, hkrati pa vplivata na vstop kalcijevega iona v gladko mišico oziroma se vežeta nanjo, s čimer neposredno povzročita relaksacijo gladkih mišic (5).

Baldrijan deluje tudi **antibakterijsko** proti Gram pozitivnim bakterijam. Ta učinek pripisujejo alkaloidom, vendar je to manj pomemben učinek (4).

Valepotriati naj bi povzročali tudi **dilatacijo koronarnih arterij** in naj bi bili zato uporabni pri terapiji aritmij. Poročali so tudi o **hipotenzivnem delovanju** droge, a je dokazov za ta učinek v literaturi zelo malo (4).

1.2.3 Uporaba

V uradnem zdravstvu

Droga korenine baldrijana se v uradnem zdravstvu v Evropi uporablja za lajšanje blagih živčnih napetosti in motenj spanja. Uporablja se v obliki ekstraktov, pripravljenih z vodo ali 40 – 70% (V/V) etanolom (19).

V ljudskem zdravilstvu

Zaradi pomirjevalnega delovanja na osrednje živčevje se baldrijan uporablja za lajšanje težav živčnega izvora (nervoza, nespečnost, živčna razdraženost, utrujenost, epileptični krči ali tremor), ugodno vpliva na posledice stresa, klimakterijskih težav, lajša težave pri srčnih obolenjih in bolečine ob menstruacijskih krčih. Pomaga pri preprečevanju napenjanja in krčih prebavil, hkrati pa deluje rahlo diuretično. Njegova uporaba je priporočljiva tudi pri infekcijskih boleznih (3, 4, 8). Pripravki, ki jih uporabljajo v ljudskem zdravilstvu, so posušena korenina, vodni pripravki iz suhega ekstrakta, tinktura, sok iz sveže korenine in olje iz korenine (19).

Pri uporabi izdelkov iz baldrijana se je potrebno držati predpisanih terapevtskih količin, po tritedenski uporabi je priporočljiv enotedenski odmor, kljub odsotnosti stranskih učinkov pa teh izdelkov naj ne bi uporabljale nosečnice, doječe matere in otroci mlajši od 12 let (8, 19).



1.2.4 Analitika droge

V peti in šesti izdaji Evropske farmakopeje je kot analizna metoda za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskimi kislin v izvlečkih baldrijana opisana metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z uporabo dantrona (Ph. Eur. 5) ali valerenske kisline (Ph. Eur. 6) kot standarda. Druge analizne metode, ki se nanašajo na snovi v korenini baldrijana so še:

- * barvni test za določanje valepotriatov iz Evropske farmakopeje iz leta 1998 (4),
- * vodna destilacija za ugotavljanje vsebnosti eteričnega olja v drogi (10).

1.3 Kromatografija

Kromatografija je separacijski proces, v katerem najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato ustrezno zaznamo s ciljem predvsem kvantitativne določitve. Doseči skušamo čim boljšo separacijo v čim krajšem času, kar naredimo z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Ločitev spojin poteka na podlagi različnih fizikalnih in kemijskih interakcij teh spojin s stacionarno fazo (SF) in mobilno fazo (MF). Porazdelitev spojin med MF in SF se ponavlja vzdolž kolone ali plošče vse dokler se ločeno ne izločijo iz kolone (14).

Glede na način povezave med SF in MF kromatografijo delimo na planarno in kolonsko kromatografijo, lahko pa jo razdelimo tudi glede na tip MF, SF in vrsto ravnotežja med njima na (14):

1. Plinsko k.:

- * plin-tekoče
- * plin-trdno

2. Tekočinsko k.:

- * tekoče-tekoče
- * tekoče-trdno
- * ionsko- izmenjevalna k.
- * izključitvena k.
- * afinitetna k.

3. Superkritično-tekočinsko k.

1.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je analitična tehnika za široko uporabo, pri kateri kot stacionarno fazo uporabljamo ali zelo majhne sferične delce premera 2 – 5 μm ali pa porozen monolitičen material, ki povzroči značilen padec tlaka na koloni. Ločitev komponent poteka pod visokim tlakom, s čimer zagotovimo enakomeren pretok.

Za to tehniko je značilna hitra in dobra ločljivost, lahko jo uporabljamo za določevanje termolabilnih spojin, zelo polarnih spojin ter spojin z veliko molekulsko maso (12).

Delitev

Glede na lastnosti stacionarne in mobilne faze ločimo naslednje vrste HPLC (14):

- * porazdelitveno kromatografijo (tekoče-tekoče ali vezano fazna kromatografija),
- * ionsko-izmenjevalno kromatografijo,
- * izključitveno oziroma gelsko kromatografijo,
- * adsorpcijsko kromatografijo.

Reverzno fazna kromatografija

Ta vrsta kromatografije spada med vezano fazno porazdelitveno kromatografijo. Temelji na nepolarni SF, ki je kemično vezana na delcih silikagela, s katerimi je polnjena kolona, in polarni MF. Nepolarno SF dobijo z reakcijo med enotnimi, poroznimi, mehansko odpornimi delci silikagela premera 3, 5 ali 10 μm , ki ima proste silanolne skupine in organoklorosilanom ($\text{RSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$), pri katerem so R alkilne verige, najpogosteje s 8 ali 18 ogljikovimi atomi. Zaradi sterični efektov lahko opisana reakcija poteče le na 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ površine delca, nezreagirane hidroksilne (OH) skupine pa lahko povzročijo neželjeno polarnost SF. Ta učinek se zmanjša z reakcijo siloksana s klorotrimetilsilanom ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$), ki se zaradi manjše velikosti lahko veže na proste OH skupine (14).

Kratke alkilne verige so primerne za ločevanje hidrofilnih vzorcev, daljše (C18) pa imajo odlično kemijsko stabilnost, prenesejo visoke pritiske, imajo hidrofobno površino in omogočajo polnjenje HPLC kolon, zaradi česar so idealne za kromatografijo na reverznih fazah. Prav tako daljše verige omogočajo analizo večjega vzorca.

Največkrat uporabljana MF je mešanica ACN/ H_2O (uporabna predvsem pri zelo nizkih valovnih dolžinah), sledita ji mešanici MeOH/ H_2O ter THF/ H_2O . Pri zelo hidrofobnih vzorcih lahko uporabljamo kombinacije teh topil brez vode.

Pri tej vrsti kromatografije pride do bistveno hitrejše vzpostavitve ravnotežnih pogojev na koloni kot pri normalno fazni kromatografiji. Čas elucije je kratek, gradientni načini izločitve pa povzročajo manjše probleme kot pri adsorpcijski kromatografiji.

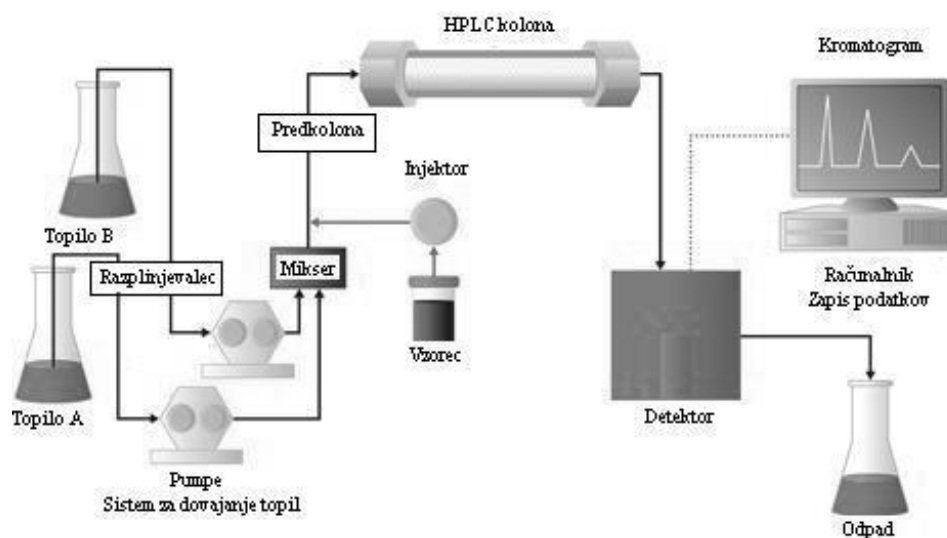
Ločitev komponent poteka na osnovi moči in selektivnosti topila, nanjo pa lahko vplivata temperatura kolone in pH. Za detekcijo spojin največkrat uporabljamo UV detektor, prve pa se izločijo najbolj polarne spojine (14).

Aparatura

HPLC sistem je sestavljen iz več specializiranih enot, ki se lahko uporabljajo posamezno ali so integrirane v skupen sestav. Enote osnovnega HPLC sistema so (slika 6):

- * rezervoar za mobilno fazo,
- * razplinjevalec,
- * črpalka,
- * avtomatski injektor,
- * termostatisirana komora s kromatografsko kolono,
- * detektor,
- * instrument za zapis signala.

Med posameznimi enotami je vzpostavljena cirkulacija mobilne faze, katero omogoča sistem cevčic iz nerjavečega materiala ali polimera polietilen - eterketon z zelo majhnim premerom, ki so odporne na visok tlak, t.j. do 350 barov (približno 5076 PSI) (12).



Slika 6: Shema osnovnega HPLC instrumenta.

REZERVOAR ZA MOBILNO FAZO IN RAZPLINJEVALEC

Mobilne faze pri HPLC shranjujemo in med delom črpamo najpogosteje iz steklenih posod, ki morajo biti dovolj tesno zaprte, da iz njih ne uhajajo hlapi topil, hkrati pa ne smejo popolnoma tesniti, saj bi drugače prišlo do nastanka podtlaka (11).

Prisotnost plinov iz ozračja (N_2 , O_2 , CO_2), raztopljenih v mobilni fazi, lahko vpliva na separacijo, saj pride do spremembe v tlaku MF, kar vodi v nastanek mehurčkov. Tem nevšečnostim se izognemo z razplinjevanjem MF z ultrazvokom, podtlakom, hitrim prepihanjem z inertnimi plini (npr. helijem) in z difuzijo (topilo potuje vzdolž polimerne cevke z majhnim premerom, ki zaradi svoje prepustnosti za pline deluje kot membrana, plini prehajajo skozi zaradi podtlaka, ki je vzdrževan na zunanji strani membrane) (12, 14).

ČRPALKA

Črpalka mora zagotavljati enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono in preprečevati pulzacije tudi ko se sestava MF spreminja. To dosežemo z nasprotno delujočima batoma, tako, da eden od njiju črpa, drugi pa se polni. Uravnavanje pretoka MF lahko izboljšamo z uporabo dušilcev tlaka (zvitke cevke, membrana s heptanom), ki jih vstavimo med črpalko in injektor. Sodobne črpalke imajo vgrajene mikroprocesorje, ki omogočajo dostavo mobilne faze konstantne (izokratična elucija) ali spreminjajoče se sestave (gradientna elucija), odvisno od programa analize. Hkrati omogočajo ponovitev nastavljenih sekvenc, kar je pomembno pri delu z avtomatskimi injektorji.

Črpalka za analitsko delo mora zadoščati zahtevam po brezpulznem delovanju, konstantnem pretoku in ponovljivosti pretoka.

INJEKTOR

Injektor mora omogočati dobro ponovljivost injiciranja med posameznimi doziranji in čim manjšo kontaminacijo med zaporednimi vzorci. Omogočati mora tudi doziranje različnih volumnov in s tem tudi različnih vsebnosti vzorca.

Danes so v uporabi izključno injektorji z dozirnimi zankami, ki omogočajo injiciranje določenega ali poljubnega volumna vzorca. Volumen takšnih zank je $1 - 100 \mu L$ za analitsko delo in od $100 \mu L$ do nekaj mL za preparativno delo.

Vzorec lahko injiciramo ročno (z dozirno iglo ali brizgo) ali z avtomatskim injektorjem, ki omogoča kontinuirano delovanje vsega sistema z istočasno časovno kontrolo vseh operacij,



potrebnih za določeno doziranje vzorca. Največjo ponovljivost se doseže z uporabo avtomatskega injektorja s fiksno vzorčno zanko (9, 11).

KOLONA

Kolona je ravna nerjaveča jeklena cevka dolžine 3 – 25 *cm* in predstavlja bistveni del HPLC sistema, saj je od njenih lastnosti odvisna separacija komponent vzorca. Notranje stene kolone so prekrte z inertnim materialom (steklo ali polimer PEEK). SF se v koloni nahaja med dvema poroznima diskoma, ki sta nameščena vsak na svojem koncu kolone. Danes uporabljamo kolone z različnimi notranjimi premeri (2 – 4 *mm*, 1 – 2 *mm*, < 1*mm*), različnih proizvajalcev in z različno velikostjo delcev SF. Življenjsko dobo kolone podaljšamo z uporabo predkolone (0,4 – 1 *cm* dolge jeklene cevke, napolnjene z enako SF kot analitična kolona), ki preprečuje kontaminacijo kolone z mehanskimi in kemijskimi primesmi iz mobilne faze in vzorca, hkrati pa upočasni raztapljanje SF v MF. Vse naštetu lahko vodi do padca ločljivosti, posedanja kolone ali povečanega pritiska na njej. Temu se s periodičnim menjavanjem predkolone izognemo. Danes za analizo uporabljamo termostatisane kolone in predkolone, saj kontrola temperature poveča kvaliteto separacije in ponovljivost analize (11, 12).

DETEKTOR

Detektor je odgovoren za zaznavo substance, ločene na koloni. Vsi detektorji temeljijo na tem, da merijo spremembo neke fizikalne količine (absorbance, mase, volumna, sipanja svetlobe...), ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. Pri HPLC analizi je zelo pomembna sposobnost detektorja za določevanje koncentracije ločene substance. Zato pri tej vrsti analize najpogosteje uporabljamo UV–VIS spektrofotometre in detektorje na niz diod (slednji omogočajo tudi kvalitativno določitev, saj lahko z njimi opazujemo celotni UV spekter ločene substance), lahko pa delamo tudi s fluorescenčnimi, elektrokemičnimi, radioaktivnimi, masnimi ali drugimi posebnimi detektorji.

Detektor mora biti občutljiv, stabilen skozi čas in zmožen filtrirati večino šumov ozadja (12).

1.4 Validacija

Validacija je sistematičen, dokumentiran postopek, ki z visoko stopnjo sigurnosti zagotavlja, da bo specifičen proces stalno deloval v skladu s predpisanimi specifikacijami in tako ustrezal namenu uporabe (16, 18). Z rezultati validirane metode lahko sodimo o kakovosti, zanesljivosti in doslednosti rezultatov HPLC metode. Validacija je ključen del dobre analitične prakse in ima tri sklope (18):

- * validacija osnovnih instrumentov oz. kalibracija,
- * validacija analizne metode,
- * preizkus ustreznosti sistema.

Preden začnemo izvajati validacijo analizne metode moramo zagotoviti dosledno upoštevanje in izvajanje pravil dobre laboratorijske prakse, potek validacije pa mora biti skrbno opisan v validacijskem protokolu, v katerem morajo biti navedeni vsi minimalni kriteriji, katerim mora metoda zadostiti. Oceno uspešnosti validacije predstavimo z obširnim poročilom, ki zajema rezultate, analize in sklepe, dobljene s preizkusi (18). Za konec moramo napisati tudi standardni operacijski postopek za prenos metode iz razvojnega stadija v rutinsko delo.

Analitik si pri izvedbi validacijskih preizkusov lahko pomaga s številnimi mednarodnimi smernicami, najbolj poznana od teh je smernica Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH), ki navaja, da je potrebno validirati naslednje štiri tipe najpogosteje uporabljenih analiznih postopkov:

- * identifikacijo,
- * kvantitativno določanje vsebnosti nečistot,
- * limitne teste za kontrolo nečistot,
- * kvantitativno določevanje vsebnosti učinkovin.

ICH tudi določa naslednjih osem parametrov validacije:

- * selektivnost oz. specifičnost,
- * linearnost,
- * točnost,
- * delovno območje,
- * meja zaznavnosti,
- * meja določljivosti,
- * natančnost,
- * robustnost,

katere od teh parametrov moramo preizkusiti, pa je odvisno od posameznega analiznega postopka.

Metodo moramo validirati ali revalidirati:

- * pred prenosom v rutinsko analitiko,
- * ko pride do spremembe pogojev (karakterističnih parametrov inštrumenta),
- * kadarkoli spremenimo metodo in ta sprememba ni bila zajeta v obsegu prejšnje validacije.

1.4.1 Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti (LOD) je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko z našo metodo zaznamo, ni pa nujno, da jo kvantitativno določimo. Eden izmed načinov določanja meje zaznavnosti po ICH (13) je s pomočjo standardne deviacije odseka na ordinati in naklona umeritvene premice po enačbi 1:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (\text{Enačba 1})$$

σ ... standardna deviacija odseka na ordinati, izračunana iz umeritvene premice standarda

S ... naklon umeritvene premice

V primeru, da LOD izračunamo, ICH predlaga validacijo dobljene vrednosti. To naj bi izvedel neodvisni analitik tako, da bi analiziral ustrezno število vzorcev, katerih koncentracija bi bila v bližini po enačbi 1 izračunane koncentracije.

1.4.2 Meja določljivosti

Meja določljivosti (LOQ) je merilo sposobnosti analiznega sistema, da zazna in kvantitativno določi kar najnižjo koncentracijo analita v vzorcu. Določimo jo enako kot mejo zaznavnosti, z uporabo enačbe 2 iz ICH:

$$\text{LOD} = \frac{10 \times \sigma}{S}, \quad (\text{Enačba 2})$$

pri čemer sta σ in S enaka kot pri meji zaznavnosti. Izračunano LOD je potrebno validirati enako kot je opisano pri meji zaznavnosti (1.4.1).

Lahko pa za določitev meje določljivosti uporabimo EURACHEM načinu, pri katerem moramo vnaprej določiti zahtevano točnost metode. Vzorce padajoče koncentracije 6x injiciramo in narišemo graf RSD% v odvisnosti od koncentracije. Meja določljivosti je vrednost na x-osi grafa, ki ustreza predhodno definirani točnosti.

1.4.3 Selektivnost / specifičnost

Selektivnost oziroma specifičnost je sposobnost metode, da nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent v vzorcu, kot so npr. drugi analiti, nečistote, razpadni produkti in spojine iz nosilca farmacevtske oblike.

Dokazati moramo, da nobena druga motnja (spojina) ne moti določitve učinkovine.

Preizkus izvedemo tako, da pripravimo raztopine uporabljenih topil, pomožnih snovi in vsake učinkovine ter vsak vzorec 2x injiciramo. ICH smernica za selektivnost predlaga objavo tipičnega kromatograma spojine, specifičnosti metode pa lahko prikažemo s testom čistote vrha, opisanim v poglavju 3.2.6 pod naslovom Specifičnost (15). Vizualni kriterij za ugotavljanje čistote vrha so čim manjša odstopanja med UV spektroma vzpona in padca posameznega kromatografskega vrha, kvantitativno pa čistoto vrha prikažemo z indeksom čistote vrha (PPI). Le – ta mora biti med 1,00 in 1,50 (20).

1.4.4 Linearnost

Linearnost je zmožnost metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije (vsebnosti) iskanega analita v vzorcu. Določimo jo s 3x - 6x injiciranjem \geq petih standardov različnih koncentracij. Standarde lahko pripravimo z redčenjem začetne raztopine ali pa z natehtanjem ustrezne količine standarda (14). Rezultate preverimo z risanjem umeritvene premice, s katero opazujemo odvisnost merjenega signala (povprečne površine) od koncentracije analita (enačba 3). Pri risanju premice je možna uporaba matematične transformacije. Kot rezultate lahko podamo koeficient korelacije, presečišče z ordinato, naklon regresijske premice in rezidualno vsoto kvadratov, vsemu naštetemu pa priložimo še grafično predstavitev. Literatura kot možen kriterij ocenjevanja linearnosti metode navaja Pearsonov koeficient korelacije r , ki naj bo $\geq 0,99$ (13).

Enačba regresijske premice: $y = b \cdot x + a$ (Enačba 3)

y ... povprečna površina pod premico a ... presečišče premice z ordinato

x ... koncentracija standardne raztopine b ... naklon premice

1.4.5 Natančnost

Natančnost metode služi za oceno medsebojne skladnosti posameznih rezultatov serije več injiciranj standarda. Podajamo jo kot standardno deviacijo (SD) ali kot relativno standardno deviacijo (RSD) več zaporednih meritev istega vzorca, ki jo izračunamo po enačbi 4.

$$RSD (\%) = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N-1}} \quad (\text{Enačba 4})$$

X_i ... posamezna meritev

\bar{X} ... povprečna vrednost meritev

N ... število meritev

ICH loči tri vrste merjenja in podajanja natančnosti:

Ponovljivost znotraj dneva

Ponovljivost metode znotraj dneva je podana kot ponovljivost znotraj kratkega časovnega obdobja, pri čemer mora vse preizkuse znotraj enega laboratorija opraviti en sam analitik.

Določamo jo z vsaj devetimi meritvami znotraj delovnega območja (npr. 3 koncentracije/3 meritve) ali s vsaj šestimi meritvami pri 100% pričakovane koncentracije analita. Kriterij je $RSD \leq 2\%$ (15).

Ponovljivost znotraj laboratorija

Znotraj laboratorijska ponovljivost zagotavlja, da bo metoda dajala enake in ponovljive rezultate znotraj istega laboratorija tudi po končanem razvoju metode. Ta parameter preizkušamo več zaporednih dni, delo pa opravljajo različni analitiki. Kriterij je $RSE \leq 3\%$ (15).

Ponovljivost med laboratoriji

Med laboratorijska ponovljivost se nanaša na ponovljivost metode v različnih laboratorijih in na različni opremi. Ta preizkus moramo opraviti, v kolikor želimo metodo standardizirati in objaviti. Rezultate ovrednotimo s statističnimi testi.

1.4.6 Točnost

Točnost metode je njena sposobnost, da je dobljeni rezultat kar najbližji pravi vrednosti oziroma da je od nje statistično nepomembno različen.

Preizkus točnosti metode izvedemo z vsaj devetimi meritvami pri vsaj treh različnih koncentracijah znotraj delovnega območja (npr. 3 koncentracije/3 meritve), rezultate pa podamo kot povprečje razmerij med s preiskovano analizno metodo izmerjeno vrednostjo in pravo vrednostjo. V literaturi (15) lahko zasledimo, da mora biti izkoristek pri analizi vsebnosti znotraj intervala 98 – 102%, vendar smo se ta interval odločili razširiti na 95 – 105%, saj preiskujemo raztopino rastlinskega materiala, za katerega je znano, da rezultati analiz bolj nihajo kot pri sintetičnih raztopinah.

1.4.7 Delovno območje metode

Delovno območje metode je območje koncentracij, znotraj katerega lahko potrdimo, da je metoda linearna, natančna in točna. Odvisno je od namena uporabe metode, opredelimo pa ga lahko iz preizkusa linearnosti in meje določljivosti. ICH smernica za metodo za

določevanje vsebnosti analitov v končnih farmacevtskih izdelkih predlaga minimalno delovno območje med 80 – 120 % testne koncentracije (13).

1.4.8 Robustnost

Robustnost metode pove, kako načrtna sprememba različnih parametrov analize vpliva na rezultate analize. Ti parametri so sestava in pH mobilne faze, kolone različnih proizvajalcev, temperatura kolone, pretok mobilne faze, valovna dolžina detekcije in drugi. Podatki, pridobljeni pri tem preizkusu, nam povedo, katere analizne pogoje moramo ustrezno nadzorovati oziroma biti na njih pozorni. Podatkov o robustnosti metode ni obvezno dodajati registracijski dokumentaciji. Mi smo se pri ocenjevanju posledic sprememb posameznega parametra analize odločili za podajanje razmerja med rezultati, dobljenimi pri spremenjenem parametru in rezultati, dobljenimi pri referenčni vrednosti parametra. Kot kriterij smo določili, da je metoda robustna na spremembo, če je dobljen delež odstopanja površine ali retencijskega časa $\leq 1\%$ ali če pride do enako velikega odstopanja pri vseh analiziranih spojinah.

1.5 Preizkus ustreznosti sistema

Preizkus ustreznosti sistema je sestavni del večine analitičnih procesov in ga moramo opraviti pred vrednotenjem validacijskih parametrov. Testiramo resolucijo, ki prikazuje sposobnost sistema za zadovoljivo separacijo dveh analitov in asimetrijo vrhov, ki izraža popačenje kromatografskega vrha (tailing). Literatura navaja kot kriterij za resolucijo, da mora biti po enačbi 5 izračunana vrednost večja od 1,5, asimetrija pa mora biti med 0,8 in 1,5, kar izračunamo po enačbi 6.

$$\text{Resolucija} \quad R = 2 \times \frac{(t_2 - t_1)}{(W_1 + W_2)} \quad (\text{Enačba 5})$$

$t_{1,2}$... retencijski časi posamezne komponente

$W_{1,2}$... širina kromatografskega vrha posamezne komponente

$$\text{Asimetrija} \quad T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (\text{Enačba 6})$$

f ... širina kromatografskega vrha na bazni liniji od začetka do maksimuma vrha

$W_{0,05}$... širina kromatografskega vrha na 5% višine vrha



2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Izdelki za zdravljenje ljudi in živali morajo biti učinkoviti, varni in kakovostni, kar preverjamo s pomočjo raznih analiznih postopkov. Osnovni cilj teh postopkov je pridobiti čim bolj pravilen rezultat (v našem primeru je to izračun vsebnosti seskviterpenskikh kislin), kar zagotovimo z validacijo postopka.

Primernost uporabe HPLC metode za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskikh kislin v izvlečkih baldrijana, ki jo predpisuje Ph. Eur. 5, bomo za naše pogoje preverili z validacijo. Vzorce, standardne raztopine in mobilni fazi bomo pripravili v skladu s predpisom v peti izdaji Evropske farmakopeje. Določili bomo po ICH obvezne parametre validacije za določevanje vsebnosti spojine, ki so selektivnost, specifičnost, linearnost, ponovljivost, točnost in delovno območje. V namene nadaljnjega raziskovalnega dela na izbrani aparaturi bomo okvirno določili tudi meji zaznavnosti in določljivosti za raztopino dantrona. Izvedli bomo tudi glede na registracijsko dokumentacijo neobvezen preizkus robustnosti, s čimer bomo dobili informacijo, na katere pogoje moramo biti pozorni pri praktičnem delu. Na osnovi dobljenih kromatogramov in podatkov bomo s pomočjo literature in lastnih spoznanj ocenili, ali bo metoda ustrezala namenu njene uporabe.

Po vzpostavitvi v Ph. Eur. 5 predpisanih kromatografskih pogojev (ustrezna kolona, temperatura, pretok, valovna dolžina in mobilna faza) bomo pred in po izvedbi validacije izvedli preizkusu ustreznosti sistema, s čimer bomo potrdili stabilnost izbranega sistema.

Pred validacijo metode bomo preizkusili stabilnost standardne raztopine v času 24 ur in petih dni. Nato bomo izvedli validacijo metode, kateri bo sledila pospešena stabilnostna študija na izbranih izdelkih. Slednjo bomo izvedli tako, da bomo dva izdelka Javnega zavoda Mariborskih lekarn za 28 dni izpostavili temperaturi 40 °C in 75% relativni vlagi in s pomočjo izbrane HPLC metode ugotavljali, ali pride v obeh izdelkih v sedem dnevnik intervalih do večje spremembe vsebnosti seskviterpenskikh kislin, kot jo dovoljuje izbran kriterij.

Vse delo v analiznem laboratoriju bo potekalo v skladu z načeli dobre proizvodne in laboratorijske prakse, s čimer bomo zagotovili ustrezno kakovost našega dela.



3 MATERIALI IN METODE

3.1 Reagenti, topila in oprema

3.1.1 Standardi

Pri validaciji metode za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskih kislin smo uporabili naslednje spojine:

- * DANTRON (SIGMA-ALDRICH (SA), > 96%, MM 240,21 g/mol) oz. 1,8-dihidroksiantraknon. Je prašek rumenorjave barve, s katerim je potrebno previdno rokovati, saj je kancerogen. V korenini baldrijana se ne nahaja, kot standard je bil najbrž izbran, ker se njegov vrh nahaja med vrhovoma acetoksivalerenske in valerenske kisline in ker ima podoben UV spekter kot prej omenjeni spojini.
- * VALERENSKA KISLINA (izolirana na Fakulteti za farmacijo, MM 234,33 g/mol)
- * IZOBORNEOL (SA, 95%, MM 154,25 g/mol),
- * (-) – BORNEOL (SA, 97%, MM 154,25 g/mol),
- * KAVNA KISLINA (MERCK, \geq 98%, MM 180,15 g/mol),
- * KLOROGENSKA KISLINA (SA, \geq 95%, MM 354,31 g/mol),
- * L – ARGININ FREE BASE (CALBIOCHEM, \geq 98%, MM 174,2 g/mol),
- * L – TIROZIN (C.P., MANN RESEARCH LAB., MM 181,19 g/mol),
- * β - SITOSTEROL (MERCK, \geq 75%, MM 414,7 g/mol),
- * (R) – (+) – LIMONEN (MERCK, \geq 94%, MM 136,24 g/mol, ρ 0,84 g/cm³),
- * (+) – α – PINEN (SA, > 97%, MM 136,23 g/mol, ρ 0,857 g/cm³).

Spojine smo med analizo hranili zaščitene pred svetlobo v hladilniku pri 4⁰C.

3.1.2 Vzorci

Za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskih kislin smo analizirali naslednja izdelka Javnega zavoda Mariborskih lekarn:

- * MIRIN BALDRIJANOVE KAPLJICE, ki je pripravljen v skladu z monografijo *Valerianae tincture* v Ph. Eur. 6 in
- * MIRIN BALDRIJANOVE KAPLJICE FORTE, ki je pripravljen v skladu z E/S/C/O/P monografijo *Valerianae radix*. Slednja kot dovoljeno količino droge v enem odmerku navaja 1 – 3 g oz. ustrezen ekvivalent ekstrakta (6). Predpisan



enkratni odmerek analiziranega pripravka je 2 mL, kar ustreza 460 mg suhega ekstrakta oziroma 1,4 – 2,8 g korenine baldrijana, saj je razmerje med drogo in ekstraktom 3 – 6 : 1.

Pri proizvodnji obeh izdelkov je bil kot ekstrakcijsko topilo uporabljen 70% (V/V) etanol. Zdravili sta bistri raztopini temno rjave barve z značilnim vonjem po baldrijanu, polnjeni sta v stekleničko z zaporko, ki vsebuje 50 mL peroralnih kapljic in je vstavljena v kartonsko škatlo skupaj z merilno kapalko in navodilom za uporabo.

3.1.3 Kemikalije

Med validacijo smo uporabljali sledeče kemikalije:

- * FOSFORJEVA KISLINA puriss p.a., for HPLC (FLUKA, SA),
- * ACETONITRIL CHROMASOLV, gradient grade, for HPLC (SA),
- * METANOL CHROMASOLV, gradient grade, for HPLC (SA),
- * VISOKO PREČIŠČENA VODA – AQUA VALDE PURIFICATA (pripravljena v Galenskem laboratoriju Javnega zavoda Mariborskih lekarn z reverzno osmozo, UV – fotooksidacijo pri 185/254 nm in ultrafiltracijo).

3.1.4 Aparature in oprema

Med validacijo smo uporabili v preglednici I navedene aparature in opremo.

Preglednica I: Uporabljene aparature in oprema.

INŠTRUMENT	PROIZVAJALEC	TIP
HPLC	PerkinElmer	LC 200 UV - VIS
	PerkinElmer	LC 200 DAD
Razplinjevalec	PerkinElmer	Series 200 Vacuum Degasser
Tehtnica	Mettler Toledo	XP 205 dd = 0,01 mg
UV kadička	Trensonic	460/H
Pipete	Socorex	0,5 - 10 mL
		10 - 100 mL
		100 - 1000 ml
	BIOHIT	PROLINE electronic
pH meter	Mettler Toledo	SevenMulti
Merilec gostote	Mettler Toledo	DR 40 Combined Meter
Stabilnostna komora	Binder	Klima komora 40 ⁰ C, 75 % RH
Priprava vode	TKA	MicroPure UV/UF

DRUGA OPREMA	
Filtri	MN 0,45 µm PTFE
Predkolona	Phenomenex Security Guard C18 4x3 mm
Kolona	Phenomenex Luna C18 4,6x250 mm S/N: 431986-15
	Phenomenex Luna C18 4,6x250 mm S/N: 459752-7



Podatke smo zajemali in obdelovali z računalniškim programom proizvajalca PerkinElmer, TotalChromom.

3.2 Metode dela

3.2.1 Priprava raztopin vzorcev

Priprava raztopine vzorca po monografiji Valerian root v Ph. Eur. 5

V bučko z okroglim dnom in vratom iz motnega stekla natančno natehtamo približno 1,5 g uprašene droge in dodamo 20 mL brezvodnega metanola R. 30 minut mešamo in segrevamo pod refluxom na vodni kopeli. Nato dobljeni kondenzat ohladimo in prefiltriramo. Filter z ostanki prenesemo v 100 mL bučko z okroglim dnom, dodamo 20 mL brezvodnega metanola R in segrevamo na vodni kopeli z uporabo refluxa 15 minut. Pustimo da se kondenzat ohladi in ga nato prefiltriramo. Filtrate združimo in razredčimo do 50 mL z brezvodnim metanolom R.

Prilagoditev priprave raztopine vzorca po Ph. Eur. 5

Mirin baldrijanove kapljice forte predstavlja raztopina suhega ekstrakta droge (3.1.2.), zaradi česar smo navodila za pripravo vzorčne raztopine po Ph. Eur. 5 priredili. Glede na razmerje med drogo in ekstraktom smo preračunali, da 1,5 g droge ustreza 1,5 mL raztopine Mirin baldrijanove kapljice forte, a smo se za namene nadaljnjega analitičnega dela v kontrolno-analiznem laboratoriju odločili delati z 1 mL vzorca.

Tako smo v 50 mL bučko odpipetirali 1 mL Mirin baldrijanovih kapljic forte in dopolnili z metanolom do oznake. Za pet minut smo raztopino dali v ultrazvočno kadičko, nato pa prefiltrirali skozi 0,45 μm membranski filter v vialo.

Priprava raztopine vzorca po monografiji Valerian tincture v Ph. Eur. 6

Razredčimo 10,0 g preiskovane tinkture do 50 mL z metanolom R.

Prilagoditev priprave raztopine vzorca po Ph. Eur. 6

V 50 mL bučko smo natančno natehtali približno 10 g Mirin baldrijanovih kapljic in dopolnili z metanolom do oznake ter dali za pet minut v ultrazvočno kadičko. Raztopino smo nato prefiltrirali skozi 0,45 μm membranski filter v vialo.



3.2.2 Priprava standardnih raztopin

Standardna raztopina po monografiji Valerian root v Ph. Eur. 5

30 mg dantrona R raztopimo v brezvodnem metanolu R in razredčimo do 100,0 mL z istim topilom. Nato 5,0 mL tako pripravljene raztopine razredčimo do 50,0 mL z brezvodnim metanolom R.

Prilagoditev priprave standardne raztopine Ph. Eur. 5

V 100,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 30 mg standarda dantrona in dopolnili z metanolom do oznake. Dobljeno raztopino smo dali za pet minut v ultrazvočno kadičko, nato odpipetirali 5,0 mL pripravljene raztopine v 50,0 mL bučko, dopolnili z metanolom do oznake, dobro premešali in prefiltrirali skozi 0,45 μm membranski filter v vialo.

Standardi pri določevanju selektivnosti metode

1. Spojine v obliki praška

Za pripravo koncentrirane raztopine smo v 5 mL bučko natančno natehtali približno 2,5 mg preiskovane spojine (poglavje 3.1.1, vse razen dantrona, limonena in α -pinena) in dopolnili z metanolom do oznake, premešali ter prefiltrirali skozi 0,45 μm membranski filter v 25 mL čašo.

Za pripravo razredčene raztopine smo odpipetirali 200 μL tako pripravljene raztopine v vialo ter dodali 800 μL metanola R.

2. Spojine v tekoči obliki

Za pripravo koncentrirane raztopine smo v plastično mikroepruveto k 20 μL preiskovane spojine ((R)-(+)-limonena in (+)-(α)-pinena iz poglavja 3.1.1) s pipeto dodali 2 mL metanola, premešali ter prefiltrirali skozi 0,45 μm membranski filter v 25 mL čašo.

Za pripravo razredčene raztopine smo odpipetirali 200 μL tako pripravljene raztopine v vialo ter dodali 800 μL metanola R.

3.2.3 Priprava mobilne faze po Ph. Eur. 5

Priprava 5 g/L raztopine fosforjeve kisline

V ustrezen volumen visoko prečiščene vode R odpipetiramo ustrezen volumen fosforjeve kisline, preračunan po enačbi 7:



$$V(\text{kislina}) = \frac{V(\text{vode}) \times 5}{\rho(\text{kislina})}, \quad (\text{Enačba 7})$$

V ... volumen

ρ ... gostota

premešamo in izmerimo pH, ki mora biti med 1,8 – 1,9. Proizvajalec naših kolon zagotavlja stabilnost SF tudi pri tako nizkih vrednostih pH (21).

Tako pri pripravi raztopine fosforjeve kisline kot pri pripravi mobilnih faz A in B moramo uporabljati ustrezno zaščitno opremo (rokavice, očala, haljo).

Mobilna faza A

Zmešamo 20% (V/V) acetonitrila in 80% (V/V) 5 g/L raztopine fosforjeve kisline.

Mobilna faza B

Zmešamo 80% (V/V) acetonitrila in 20% (V/V) 5 g/L raztopine fosforjeve kisline.

V preglednici II je prikazan pri našem delu uporabljen potek spreminjanja deležev MF med analizo posameznega vzorca. Ph. Eur. 5 predpisuje izvajanje prvega koraka samo 5 min, medtem ko smo ga mi izvajali 5,5 min. Zaradi slednjega je bilo pri nas izvajanje drugega koraka pol minute krajše kot po Ph. Eur. 5. Tudi zadnjega koraka peta izdaja Evropske farmakopeje ne vključuje, mi smo ga izvedli, zato da sta bila deleža MF pred naslednjim injiciranjem zagotovo takšna kot predvideva prvi korak analize.

Preglednica II: Spreminjanje deleža posamezne mobilne faze med potekom analize

Čas [min]	Mobilna faza A [% (V/V)]	Mobilna faza B [% (V/V)]	Komentar
0 – 5,5	55	45	izokratično
5,5 – 18	55 → 20	45 → 80	linearno
18 – 20	20	80	izokratično
20 – 22	20 → 55	80 → 45	linearno
22 – 30	55	45	izokratično

3.2.4 Parametri analize s HPLC

Analizo specifičnosti smo opravili s sistemom HPLC–LC 200 DAD z detektorjem na niz diod, analize preostalih validacijskih parametrov pa s HPLC–LC 200 UV–VIS z UV–VIS detektorjem. Parametre, ki smo jih uporabljali med analizo smo zbrali v preglednici III.

Preglednica III: Parametri analize s HPLC.

Čas analize	30 minut
Kolona	$l = 250$ mm, $\phi = 4,6$ mm, velikost delcev = 5 μ m
Mobilna faza	Gradient ACN : voda
Povprečni tlak	2000 PSI (138 bar)
Presežni volumen vzorca	30 μ L
Pretok	1,5 ml / min
Temperatura kolone	25 $^{\circ}$ C
Valovna dolžina detekcije	220 nm
Volumen igle za vzorec	250 μ L
Volumen injiciranja	20 μ L
Volumen zanke	200 μ L
Y – os kromatograma	Od – 30 do 1000 mV
Zajemanje podatkov	10 točk / s
Zračni mehurček	15 μ L

Obdelava kromatografskih podatkov

Integracija

Površine pod vrhovi smo merili s pomočjo digitalnega integratorja, ki je del programskega paketa TotalChrom. Integratorju smo določili naslednje parametre:

- * Prag šuma = 10 μ V
- * Prag površine = 500 μ V*s
- * Faktor glajenja = 8 točk



3.2.5 Stabilnost standardov

Stabilnost raztopine dantrona znotraj dneva

V skladu s postopkom za pripravo standarda (3.2.2) smo pripravili 30 mg/L raztopino dantrona. Viali tako pripravljene raztopine in metanola smo postavili v pladenj avtomatskega vzorčevalnika naše aparature, ki ni imel funkcije regulacije temperature. Prvo smo injicirali MeOH, temu je sledilo injiciranje STD ter tako izmenjaje naprej do poteka 24 ur. Kot kriterij smo določili, da mora biti površina vrhov dantrona vseh 24 ur znotraj intervala 95-105% iz dobljenih rezultatov izračunane povprečne površine pod krivuljo (AUC).

Stabilnost raztopine dantrona med dnevi

Na začetku analize stabilnosti standarda med dnevi smo natančno natehtali približno 30 mg dantrona in ga raztopili v 100 mL metanola. Iz tako pripravljene raztopine smo v 50 mL bučko vsak dan odmerili 5 mL, dopolnili do oznake z metanolom ter 3x injicirali. Začetno raztopino smo vseh pet dni hranili zaščiteno pred svetlobo v hladilniku s temperaturo 4 °C. Povprečna AUC vrha dantrona mora biti vseh pet dni znotraj intervala 95-105% iz dobljenih rezultatov izračunane povprečne AUC.

3.2.6 Validacija HPLC metode za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskkih kislin

Med validacijo HPLC metode za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskkih kislin smo preizkusili naslednje parametre: selektivnost, specifičnost, linearnost, natančnost, točnost in delovno območje. Za nadaljnje raziskave smo za metodo določili tudi okvirni meji zaznavnosti in določljivosti ter robustnost.

Meji zaznavnosti in določljivosti

Meji zaznavnosti (LOD) in določljivosti (LOQ) metode za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskkih kislin smo določili v skladu z ICH smernicami, po metodi določanja SD, ki temelji na standardnem odklonu (SD) y–presečišča umeritvene premice standarda dantrona. Preizkus smo opravili ločeno od preizkusa linearnosti tako, da smo pet dni po 5x injicirali standardne raztopine dantrona različnih koncentracij, pripravljene po postopku, opisanem v 3.2.2 in razredčene kot je prikazano v preglednici IV. Nove standardne raztopine smo pripravili 3.11., 10.11. in 18.11.2008. Prvi dan smo injicirali raztopine dantrona s konc. v območju 0,3–30 mg/L, a smo ugotovili, da dobimo prevelike odzive,

zato smo za naslednje testiranje pripravili raztopine konc. od 0,006 do 3,00 mg/L. Od slednjih konc. integrator ni zaznal najnižje konc. (t. j. 0,006 mg/L), zato smo pri naslednjih treh analizah LOD in LOQ to konc. izpustili ter delali samo z intervalom konc. 0,015-3,00 mg/L.

Nato smo z dobljenimi podatki (vsemi razen podatki raztopin konc. 6,05 in 30,23 mg/L od 3.11.2008) narisali umeritveno premico, izvedli linearno regresijo in dobili vrednosti naklona in SD y–presečišča umeritvene premice (izračunano s programom za risanje grafov). Čeprav smo posamezno standardno razt. injicirali le 5x, smo za primerjavo mejo določljivosti ugotavljali tudi vizualno po EURACHEM načinu, opisanem v poglavju 1.4.2.

Preglednica IV: Prikaz priprave standardnih raztopin za določevanje LOD in LOQ.

3.11., 7.11.2008	m(STD10):	75,57 mg	V:	0,25 L
10.11., 11.11. 2008	m(STD10):	74,75 mg	V:	0,25 L
18.11.2008	m(STD10):	30,26 mg	V:	0,10 L

3.11.2008	V _{STD10} [mL]	V _{STD6} [mL]	V _{MeOH} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1		0,50	10,0	0,30
STD2		1	10,0	0,60
STD3		2	10,0	1,21
STD4		3	10,0	1,81
STD5		5	10,0	3,02
STD6	0,5		25	6,05
STD7	5		50	30,23

7.11.2008	V _{STD10} [mL]	V _{STD8} [mL]	V _{STD4} [mL]	V _{MeOH} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1			1,00	10,0	0,006
STD2			5	20,0	0,015
STD3			5	10,0	0,030
STD4		1		50,0	0,060
STD5		1		20,0	0,151
STD6		1		10	0,302
STD7		2		10	0,605
STD8	1			100	3,023

10.11., 11.11.2008	V _{STD10} [mL]	V _{STD7} [mL]	V _{STD3} [mL]	V _{MeOH} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1			5	20,0	0,015
STD2			5	10,0	0,030
STD3		1		50,0	0,060
STD4		1		20,0	0,150
STD5		1		10	0,299
STD6		2		10	0,598
STD7	1			100	2,99

18.11.2008	V _{STD10} [mL]	V _{STD7} [mL]	V _{STD3} [mL]	V _{MeOH} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1			5	20,0	0,015
STD2			5	10,0	0,030
STD3		1		50,0	0,061
STD4		1		20,0	0,151
STD5		1		10	0,303
STD6		2		10	0,605
STD7	1			100	3,03

Specifičnost

Ta parameter smo preizkušali na aparaturi z DAD detektorjem, saj smo potrebovali spekter spojin pri valovnih dolžinah od 200 do 500 nm. Želeli smo namreč dokazati, da ima pri izbrani valovni dolžini vrh res le iskana spojina, ne pa tudi kakšna nečistota ali razpadni produkt. To bi se pokazalo v spremembi UV spektrov vzpona in padca kromatografskega vrha izbrane spojine, posledično pa bi tako dobivali nepravilne rezultate. Zato smo za acetoksivalerensko in valerensko kislino ter dantron izvedli test čistote vrhov. Dantron smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2, Mirin baldrijanove kapljice forte po postopku, opisanem v 3.2.1, ter posneli UV spektre zgoraj naštetih spojin.

Dobljene spektre vzpona in padca vsake spojine posebej smo najprej normirali tako, da smo vse vrednosti absorbance (A) v spektru delili z maksimalno vrednostjo A posameznega spektra. Delali smo le z vrednostmi A, večjimi od 0,1. Nato smo za vsako spojino posebej delili UV spekter vzpona z UV spektrom padca. Dobili smo ravno krivuljo (RAZLIKA na slikah 11, 12, 13 v poglavju 4.3.3), vzporedno x-osi (manjša so odstopanja od ravne krivulje, bolj sta spektra identična). Ker so bila prisotna majhna odstopanja od te krivulje, smo ta kvantitativno ovrednotili s PPI, ki smo ga izračunali po enačbi 8:

$$PPI = \frac{\text{maksimalna vrednost ravne krivulje}}{\text{minimalna vrednost ravne krivulje}}, \quad (\text{Enačba 8})$$

Popolnoma identična spektra dasta PPI = 1, vendar je izveden preizkus zelo občutljiv, dva spektra pa sta redko popolnoma enaka. Zato iz praktičnega dela izhaja, da sta spektra, katerih PPI je znotraj intervala 1,00 – 1,50, enaka, kar pomeni, da je preiskovani vrh čist (20).

Spektre vzpona in padca posamezne spojine smo tudi narisali, jih prekrili ter vizualno primerjali prekrivanje obeh krivulj.

Slabost testa čistote vrhov je, da lahko potrdi le prisotnost nečistote, ne pa tudi absolutne čistote vrha. Pri idealnih pogojih lahko zaznamo 0,05 – 0,1% nečistot, če se njihovi spektri dovolj razlikujejo od spektra glavne spojine (15).

Selektivnost

V skladu s postopkom za pripravo standardov za selektivnost (3.2.2) in postopkom za pripravo vzorcev (3.2.1) smo pripravili koncentrirane in razredčene raztopine pripravka Mirin baldrijanove kapljice forte in standardov dantrona (30 mg/L oz. $4,79 \times 10^{-3}$ mol/L), valerenske kisline ($4,27 \times 10^{-4}$ mol/L), β -sitosterola ($1,81 \times 10^{-4}$ mol/L), limonena (0,01 mol/L), α -pinena (0,01 mol/L), borneola ($6,29 \times 10^{-4}$ mol/L), izoborneola ($6,16 \times 10^{-4}$ mol/L),

kavne kisline ($5,44 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), klorogenske kisline ($2,68 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), L-arginina ($5,63 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) ter L-tirozina ($5,52 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$). Vse molarne koncentracije so koncentracije razredčenih raztopin. Vsi koncentrirani standardi v obliki praška, razen dantrona, imajo masno koncentracijo okoli 500 mg/L , v razredčeni obliki pa 100 mg/L . Limonen ima v koncentrirani obliki masno konc. 7815 mg/L , v razredčeni pa 1563 mg/L . α -pinen ima v koncentrirani obliki konc. 8230 mg/L , v razredčeni pa 1646 mg/L . Da se te spojine poleg številnih drugih nahajajo v korenini *Valerianae officinalis sp.*, smo razbrali iz literature (4). Pripravili smo tudi kombinirano raztopino (v 25 mL čašo smo odpipetirali $400 \mu\text{L}$ koncentriranega standarda in $1600 \mu\text{L}$ vzorca), vse injicirali ter posneli kromatograme. Dokazana selektivnost je pogoj za nadaljevanje validacije izbrane metode.

Linearnost

Linearnost metode smo preverili na območju koncentracij med $0,15 \text{ mg/L}$ in 150 mg/L , z devetimi različnimi koncentracijami raztopine standarda dantrona (preglednica V), ki smo jih pripravili v skladu s postopkom za pripravo standardov (3.2.2) ter posneli kromatograme. Za vsak dan smo z uporabo povprečnih AUC, dobljenih po petih injiciranjih, narisali umeritveno premico. Rezultate smo ovrednotili s pomočjo enačb umeritvenih premic, z determinacijskim koeficientom R^2 in z vizualno ocenitvijo linearnosti premice iz grafov posameznih dni. Preizkus smo izvajali pet dni.

Preglednica V: Prikaz priprave standardnih raztopin za določevanje linearnosti metode.

	2.2.,3.2.,6.2.2009	m(STD10):	30,35 mg	V:	0,1 L	
	10.2.,12.2.2009	m(STD10):	30,17 mg	V:	0,1 L	
	V_{STD10}	V_{STD6}	V_{STD4}	V_{MeOH}	Konc. [mg/L]	Konc. [mg/L]
	[mL]	[mL]	[mL]	[mL]	2.2., 3.2.,	10.2.,12.2.2009
					6.2.2009	
STD1			0,50	10,0	0,15	0,15
STD2			2	10,0	0,61	0,60
STD3			5	10,0	1,52	1,51
STD4		2		20,0	3,04	3,02
STD5		5		10,0	15,18	15,09
STD6	5			50	30,35	30,17
STD7	3,75			25	45,53	45,26
STD8	2			10	60,70	60,34
STD9	5			10	151,75	150,85



Natančnost

Ponovljivost znotraj dneva

Pripravili smo tri različne koncentracije raztopine iz 300 mg/L raztopine standarda dantrona (3.2.2), tako da smo redčili kot je prikazano v preglednici VI. Vsako raztopino smo 10x injicirali. Kot rezultat smo podali povprečno površino teh 10 injiciranj, SD in RSD.

Preglednica VI: Prikaz priprave raztopin standarda dantrona za določevanje ponovljivosti znotraj dneva.

	m_{STD10} [mg]	V [L]
	30,09	0,1

	V_{STD10} [mL]	V_{STD2} [mL]	V_{MeOH} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1		5	10	15,05
STD2	5		50	30,09
STD3	3,75		25	45,14

Ponovljivost znotraj laboratorija

Pri preizkusu ponovljivosti znotraj laboratorija smo v obdobju desetih dni vsak dan opravili meritve petih različnih koncentracij standarda dantrona. Ponovljivost prvih petih dni smo ovrednotili z rezultati standardnih raztopin označenih s STD4-STD8, dobljenimi pri preizkusu linearnosti (preglednica V v poglavju 3.2.6, naslov Linearnost). Za nadaljevanje preizkusa ponovljivosti smo nato šesti in osmi dan pripravili novi raztopini standarda dantrona (3.2.2) ter ju redčili kot je zapisano v preglednici VII. Vse raztopine smo 5x injicirali.

Preglednica VII: Prikaz priprave standardnih raztopin dantrona za preizkus ponovljivosti znotraj laboratorija.

	m_{STD6} [mg]	V [L]:
17.2., 18.2.2009	30,28	0,1
23.2., 24.2., 25.2.2009	30,31	0,1

	V_{STD6} [mL]	V_{STD3} [mL]	V_{MeOH} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1		1	10	3,03 3,03
STD2		5	10	15,14 15,16
STD3	5		50	30,28 30,31
STD4	3,75		25	45,42 45,47
STD5	2		10	60,56 60,62

Točnost

Točnost smo določili v skladu z ICH smernicami (13) tako, da smo enaki V/V koncentraciji raztopine Mirin baldrijanove kapljic forte (V_{vz} v preglednici X), pripravljene po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1, dodali standardne raztopine dantrona petih različnih koncentracij (pripravljene kot je opisano v poglavju 3.2.2 in kot kažeta preglednici VIII in X). Osnovno standardno raztopino (STD6) smo pripravili vsak dan pred začetkom analize. Vsakega od standardov smo petkrat injicirali. Koncentracijo dantrona v raztopini vzorca z dodatkom standarda dantrona smo določili s pomočjo umeritvene premice (3x smo injicirali standardne raztopine dantrona (3.2.2), pripravljene kot kažeta preglednici VIII in IX) ter izračunali izkoristek metode.

Preglednica VIII: Natehte dantrona za pripravo raztopin za umeritveno premico in preizkus točnosti metode.

	m_{STD6} [mg]	V [L]:
27.2.2009	30,07	0,1
2.3.2009	30,18	0,1
3.3.2009	30,3	0,1

Preglednica IX: Priprava standardnih raztopin dantrona za umeritveno premico.

	V_{STD6} [mL]	V_{STD2} [mL]	V_{MeOH} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1		5	10	15,04
				15,09
				15,15
STD2	5		50	30,07
				30,18
				30,30
STD3	3,75		25	45,11
				45,27
				45,45

Preglednica X: Priprava raztopin Mirin baldrijanovih kapljic forte z dodatkom standarda dantrona za preizkus točnosti metode.

	V _{STD6} [mL]	V _{STD3} [mL]	V _{MeOH} [mL]	V _{VZ} [mL]	Konc. [mg/L]
STD1		5	10	0,2	15,04 15,09 15,15
STD2		7,5	10	0,2	22,55 22,64 22,73
STD3	5		50	1	30,07 30,18 30,30
STD4	2,5		20	0,4	37,59 37,73 37,88
STD5	3,75		25	0,5	45,11 45,27 45,45

Delovno območje

Delovno območje smo določili s pomočjo podatkov iz preizkusov linearnosti, meje določljivosti, natančnosti in točnosti.

Robustnost

V sklopu testiranja robustnosti metode smo preizkušali naslednje vrednosti izbranih parametrov:

- * temperature: 24 °C, 25 °C in 26 °C,
- * pretoki: 1,4 mL/min, 1,5 mL/min in 1,6 mL/min,
- * koncentracija fosforjeve kisline: 4,5 g/L, 5,0 g/L in 5,5 g/L,
- * kolone: druga serija istega proizvajalca in drug proizvajalec,
- * valovne dolžine: 218, 219, 220, 221 in 222 nm.

Vse parametre smo analizirali tako, da smo po v poglavjih 3.2.1 in 3.2.2 opisanih postopkih pripravili raztopini Mirin baldrijanovih kapljic forte (VZ1) in dantrona koncentracije 30 mg/L ter raztopino kombinacije obeh (VZ2). Slednjo smo pripravili tako, da smo v 50 mL bučko odpipetirali 1 mL Mirin baldrijanovih kapljic forte in 5 mL raztopine dantrona koncentracije 300 mg/L ter dopolnili do oznake z metanolom. Vsako od treh raztopin smo 3x injicirali. Preizkus robustnosti metode na spreminjanje temperature in



pH mobilne faze smo izvajali 3 dni, vse tri dni smo uporabljali 300 mg/L raztopino dantrona, pripravljeno prvi dan analize posameznega parametra. Preizkus robustnosti metode na spreminjanje proizvajalca in serijske številke kolone smo izvajali 2 dni, 300 mg/L raztopino dantrona smo pripravili prvi dan analize. Robustnost metode na spreminjanje pretoka in valovne dolžine smo preverili v enem dnevi s takrat pripravljeno standardno raztopino dantrona. Postopek izračuna rezultatov smo zaradi lažje predstave napisali v obliki enačb 9 in 10.

$$\% \text{ odstopanja AUC} = \left(\left(\frac{\sum_1^n \left(\frac{\text{AUC VZ1 ali VZ2}}{\text{AUC STD ali STD iz VZ2}} \right)_{\text{spremenjena vrednost parametra}}}{\frac{\sum_1^n \left(\frac{\text{AUC VZ1 ali VZ2}}{\text{AUC STD ali STD iz VZ2 STD}} \right)_{\text{referenčna vrednost parametra}}}n} \right) - 1 \right) * 100$$

(Enačba 9)

$$\% \text{ odstopanja } t_r = \left(\left(\frac{\sum_1^n \left(\frac{(t_r \text{ VZ1 ali VZ2})_{\text{spremenjena vrednost parametra}}}{(t_r \text{ VZ1 ali VZ2})_{\text{referenčna vrednost parametra}}} \right)}n \right) - 1 \right) * 100$$

(Enačba 10)

AUC ... površina pod krivuljo [mAU*s]

t_r ... retencijski čas [min]

n ... število injiciranj

VZ ... vzorec

3.2.7 Pospešena stabilnostna študija

Za izvedbo 28 dnevne pospešene stabilnostne študije smo ob času 0 dali po štiri izdelke Mirin baldrijanovih kapljic in Mirin baldrijanovih kapljic forte v komoro s 40 °C in 75% relativne vlage. Izdelke smo v komoro dali v njihovi primarni in sekundarni embalaži. Vsakih 7 dni smo iz komore vzeli po en izdelek Mirin baldrijanovih kapljic in Mirin baldrijanovih kapljic forte ter pripravili raztopini po postopku za pripravo vzorcev (3.2.1). Za potrebe izračuna vsebnosti smo ob časih 0, 7, 14, 21 in 28 dni injicirali tudi standard dantron, ki smo ga pripravili po postopku za pripravo standardov (3.2.2). Raztopine smo 5x injicirali, vsebnost seskviterpenskikh kislin (SK) pa izračunali s pomočjo enačbe 11 iz monografije Valerian root v Ph. Eur. 5 (9). Kot kriterij smo določili, da mora biti vsebnost SK znotraj intervala 95-105% pričakovane vsebnosti (22).

Vsebnost seskviterpenskikh kislin v obeh izdelkih smo izračunali po enačbi 11:

$$\% SK = \frac{\left[\frac{A_{AVA} \times 11,51}{A_{ST}} + \frac{A_{VA} \times 8,09}{A_{ST}} \right] \times m_{ST}}{m_{VZ}} \quad (\text{Enačba 11})$$

- A_{ST} ... povprečna AUC dantrona na kromatogramu standardne raztopine
- A_{AVA} ... povprečna AUC acetoksivalerenske kisline na kromatogramu preiskovane raztopine
- A_{VA} ... povprečna AUC valerenske kisline na kromatogramu preiskovane raztopine
- m_{ST} ... natehta dantrona (g)
- m_{VZ} ... masa preiskovane raztopine (10 g pri Mirin baldrijanovih kapljicah in 1 ml pri Mirin baldrijanovih kapljicah forte, saj pri slednjih 1ml ustreza 1g droge)

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Preizkus ustreznosti sistema

Preizkus ustreznosti kromatografskega sistema smo opravili pred pričetkom in po koncu preizkusa validacijskih parametrov na vzorcu Mirin baldrijanove kapljice forte, ki smo ga pripravili po postopku za pripravo vzorcev (3.2.1) in 5x injicirali. Posneli smo kromatograme in izračunali parametre za ovrednotenje ustreznosti sistema (preglednica XI). Vrednotili smo resolucijo med vrhovoma acetoksivalerenske in valerenske kisline in asimetrijo teh dveh vrhov.

Preglednica XI: Izračunane resolucije in asimetrije sistema pred in po izvedbi validacije metode.

$R_{\text{pred validacijo}} = 28,83$	$T_{\text{pred}} (\text{acetoksivalerenska kislina}) = 1,13$
$R_{\text{po validaciji}} = 29,40$	$T_{\text{pred}} (\text{valerenska kislina}) = 1,17$
	$T_{\text{po}} (\text{acetoksivalerenska kislina}) = 1,06$
	$T_{\text{po}} (\text{valerenska kislina}) = 1,04$

Iz rezultatov je razvidno, da je sistem pred in po validaciji ustrezen, resolucija je namreč vedno večja od 1,5, faktor asimetrije pa je pred in po validaciji za oba vrhova znotraj intervala 0,8 – 1,5. Opravljene meritve zaradi majhnega vzorca niso podprte s statistiko, saj smo jih opravili le za pridobitev okvirnih vrednosti resolucije in asimetrije. Te vrednosti bodo potrjene kasneje med rednimi analizami izbranih izdelkov iz baldrijana v kontrolno-analiznem laboratoriju.

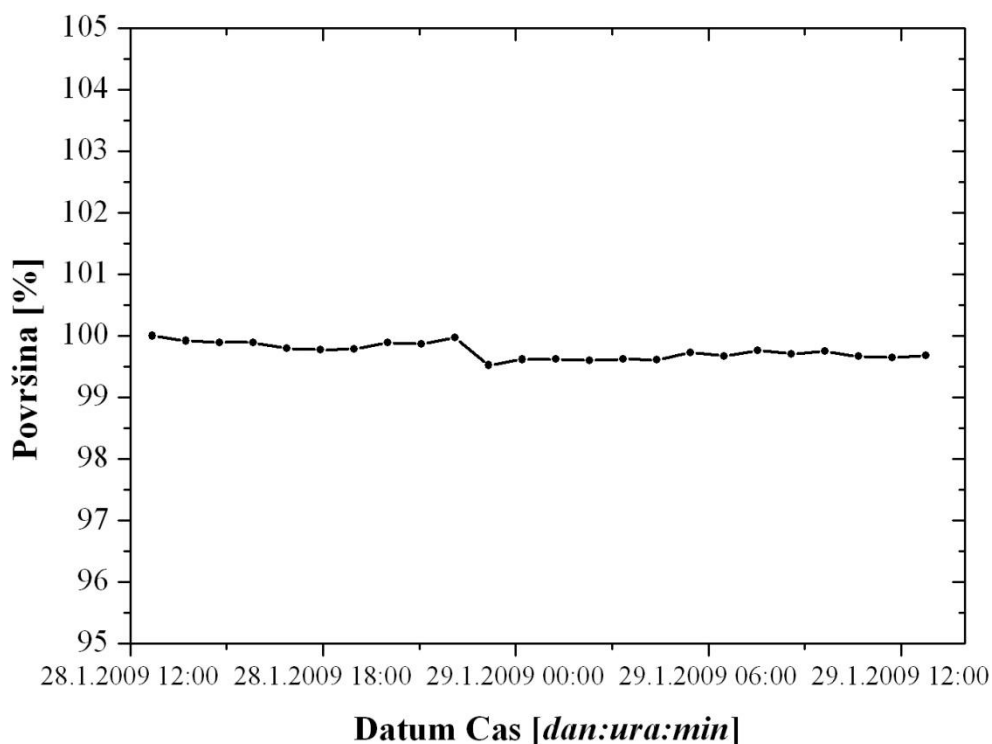
4.2 Stabilnost standardnih raztopin

Stabilnost raztopine dantrona znotraj dneva

Znotraj dnevno stabilnost dantrona smo preizkusili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.5, rezultati pa so predstavljeni v preglednici XII.

Preglednica XII: Rezultati analize stabilnosti znotraj dneva za standardno raztopino dantrona.

KONCENTRACIJA [mg/L]	POVPREČNA AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD [%]
30,16	3257,87	4,27	0,13



Slika 7: Grafični prikaz stabilnosti raztopine dantrona znotraj dneva.

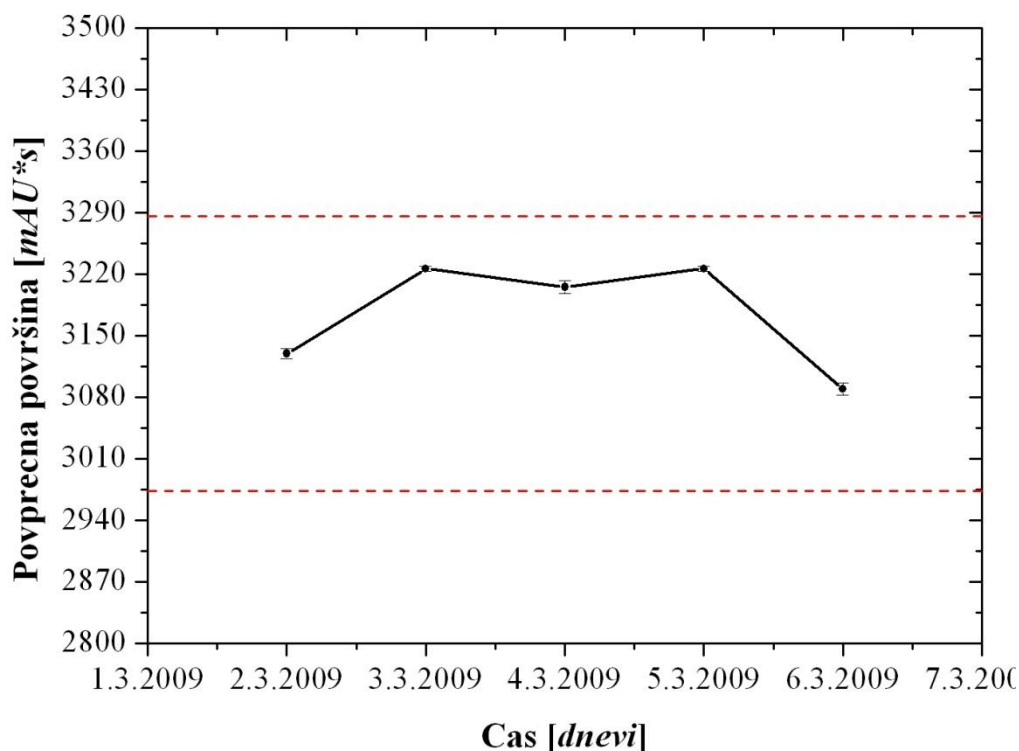
Analiza stabilnosti raztopine standarda dantrona znotraj enega dneva je pokazala, da je raztopina v tem obdobju stabilna, saj je dobljen RSD le 0,13%. Stabilnost raztopine lahko ocenimo tudi vizualno s pomočjo AUC (slika 7), ki je skozi 24 ur zelo malo nihala in je bila ves čas znotraj zahtevanega intervala 95-105%. Na sliki sicer lahko opazimo trend padanja AUC v odvisnosti od časa, vendar je ta trend zelo neizrazit.

Stabilnost raztopine dantrona med dnevi

V preglednici XIII so podani rezultati analize med dnevne stabilnosti standardne raztopine dantrona, vizualno pa so ti rezultati predstavljeni na sliki 8.

Preglednica XIII: Rezultati analize med dnevne stabilnost standardne raztopine dantrona.

DAN	KONCENTRACIJA [mg/L]	POVPREČNA AUC [mAU*s]	POVPREČNA AUC [%]	SD [mAU*s]	RSD [%]
1,00	30,18	3129,59	100,00	5,41	0,17
2,00	30,18	3226,15	103,09	2,91	0,09
3,00	30,18	3205,32	102,42	7,45	0,23
4,00	30,18	3226,14	103,09	2,77	0,09
5,00	30,18	3089,26	98,71	6,72	0,22



Slika 8: Grafični prikaz stabilnosti raztopine dantrona med dnevi.

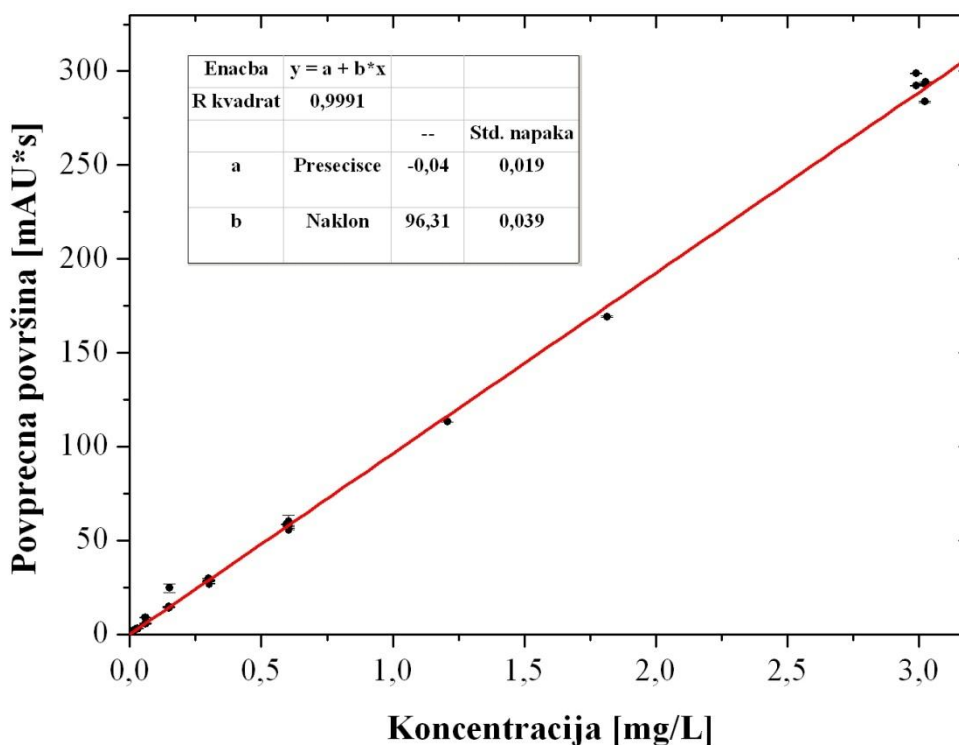
Stabilnost raztopine dantrona med dnevi pričakovano bolj niha kot znotraj štiriindvajsetih ur, vendar dobljeni relativni standardni odkloni, ki so za vse dni manjši od 1%, kažejo, da je raztopina stabilna vseh pet dni. Na sliki 8 ni opaziti nobenega trenda, na osnovi katerega bi lahko predvideli čas nastopa neustreznosti raztopine standarda.

4.3 Validacija izbrane HPLC metode

4.3.1 Meja zaznavnosti

Iz slike 9 je razvidno, da je standardni odklon y -presečišča premice linearne regresije pri valovni dolžini 220 nm znašal 0,019 mAU*s, naklon premice b pa 96,31 mAU*s L/mg. Iz teh podatkov smo po enačbi 1 izračunali, da je meja zaznavnosti (LOD) za dantron pri 220 nm enaka 0,00065 mg/L. Glede na v poglavju 3.2.6 pod naslovom Meja zaznavnosti in določljivosti zapisano ugotovitvijo, da aparaturna med delom ni zaznala raztopine dantrona koncentracije 0,006 mg/L, ki bi jo glede na zgoraj izračunano mejo zaznavnosti še morala prikazati, smo preverili ali je možno, da te koncentracije ni zaznal integrator aparature, vrh pa je na kromatogramu vseeno viden. Ugotovili smo, da je res tako, a nastavitve integriranja nismo spreminjali, saj bi to vplivalo tudi na rezultate, dobljene pri preizkusih

drugih parametrov validacije metode. Izračunane LOD nismo validirali kot to predlaga ICH (13), saj njeno določevanje v našem primeru ni obvezno in smo ta preizkus opravili zgolj v informativne namene.

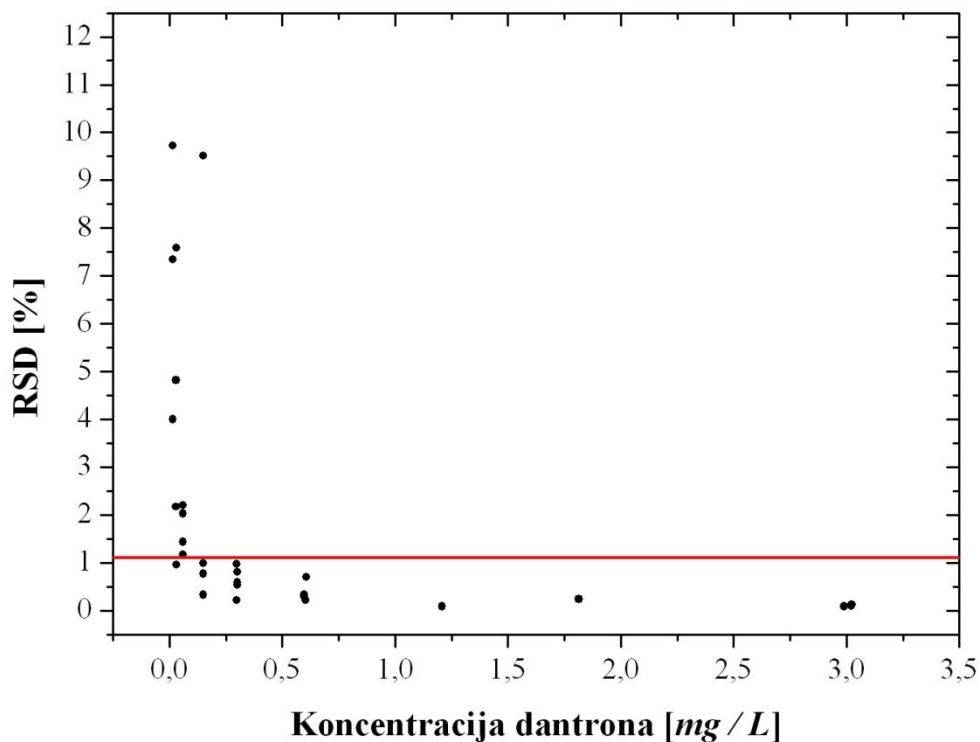


Slika 9: Graf vseh povprečnih AUC raztopin koncentracij 0,015-3 mg/L v odvisnosti od koncentracije ter enačba premice linearne regresije za preizkus meje zaznavnosti metode.

4.3.2 Meja določljivosti

Z enakimi podatki kot pri meji zaznavnosti smo po enačbi 2 izračunali tudi mejo določljivosti (LOQ) in ugotovili, da znaša 0,00197 mg/L. Zaradi enakih razlogov kot v poglavju 4.3.1, tudi tukaj izračunane vrednosti nismo validirali, kot to predlaga ICH smernica.

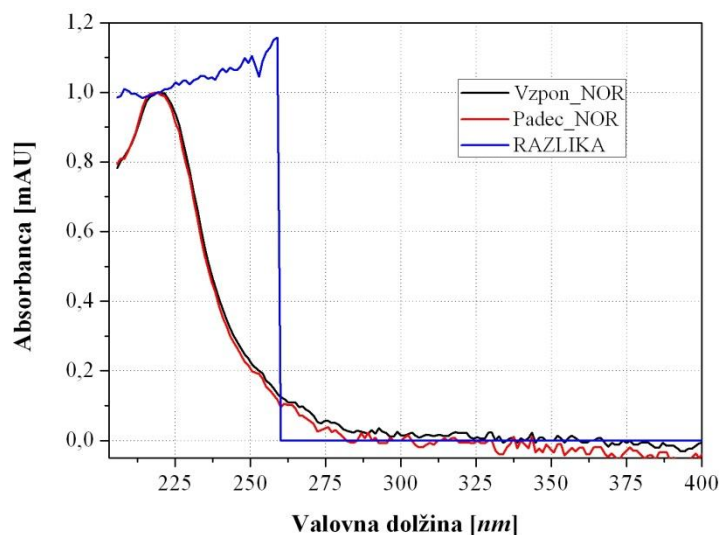
Mejo določljivosti smo ocenili še iz grafa po EUROCHEM, kjer smo kot zahtevano točnost upoštevali vrednost RSD% (za pet injiciranj in $B = 3,0$) iz tabele 2.2.46.-1. v Ph. Eur. 5 (9), ki je 1,10. Iz slike 10 smo tako razbrali, da je LOQ enaka 0,3 mg/L. Različnost LOQ, dobljenih po ICH enačbi in po EURACHEM, lahko pripišemo temu, da enačba 2 iz ICH dopušča skoraj 10x večjo napako kot farmakopeja v tabeli 2.2.46.-1. EURACHEM način smo uporabili kljub temu, da smo raztopino dantrona injicirali le 5x, saj smo pri preizkusu natančnosti (4.3.6) pokazali, da je znotraj dnevna ponovljivost rezultatov ustrezna.



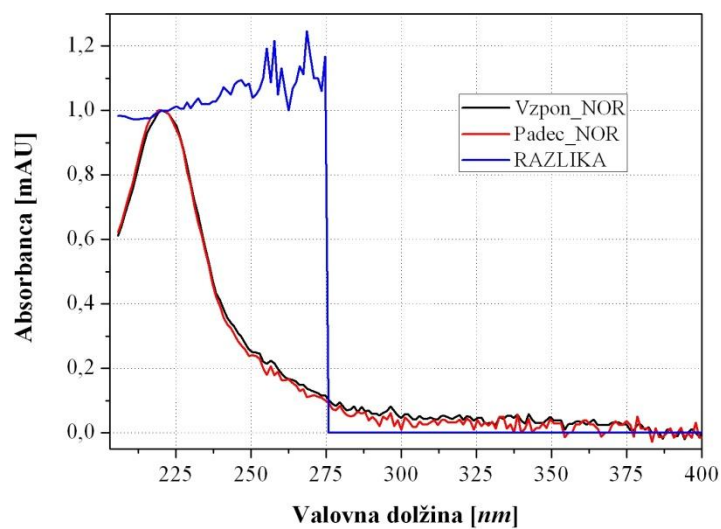
Slika 10: Graf vseh izračunov RSD v odvisnosti od koncentracije standardne raztopine dantrona za vizualno določitev meje določljivosti po EURACHEM načinu ob zahtevani točnosti RSD% = 1,10.

4.3.3 Specifičnost

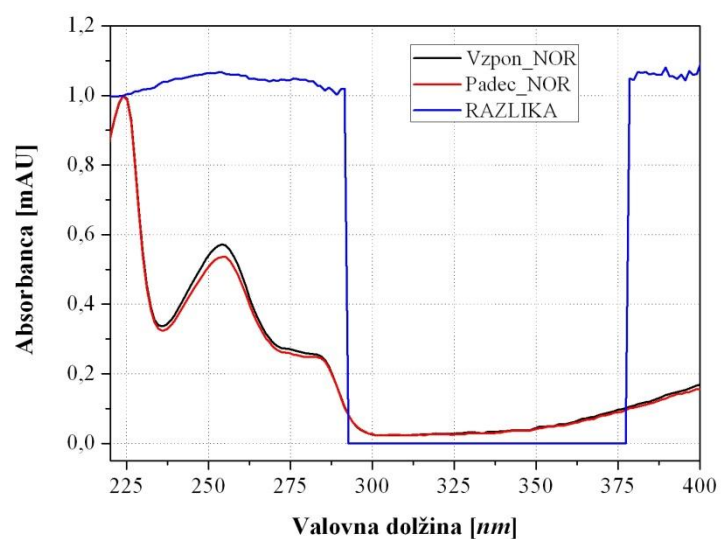
Z detektorjem na niz diod smo posneli UV–VIS absorpcijske spektre za vrhove acetoksivalerenske (slika 11) in valerenske kisline (slika 12) v vzorcu ter absorpcijski spekter vrha dantrona v standardni raztopini (slika 13).



Slika 11: UV-VIS spekter in grafična predstavitev čistote vrha acetoksivalerenske kisline.



Slika 12: UV-VIS spekter in grafična predstavitev čistote vrha valerenske kisline.



Slika 13: UV-VIS spekter in grafična predstavitev čistote vrha standarda dantrona.



Iz slik 11, 12 in 13 je razvidno, da za vsako spojino dobimo dokaj ravno krivuljo (RAZLIKA v legendi), vzporedno x-osi, kar nakazuje na to, da je posamezen vrh čist (poglavje 3.2.6, naslov Specifičnost). To domnevo preverimo še z izračunom PPI.

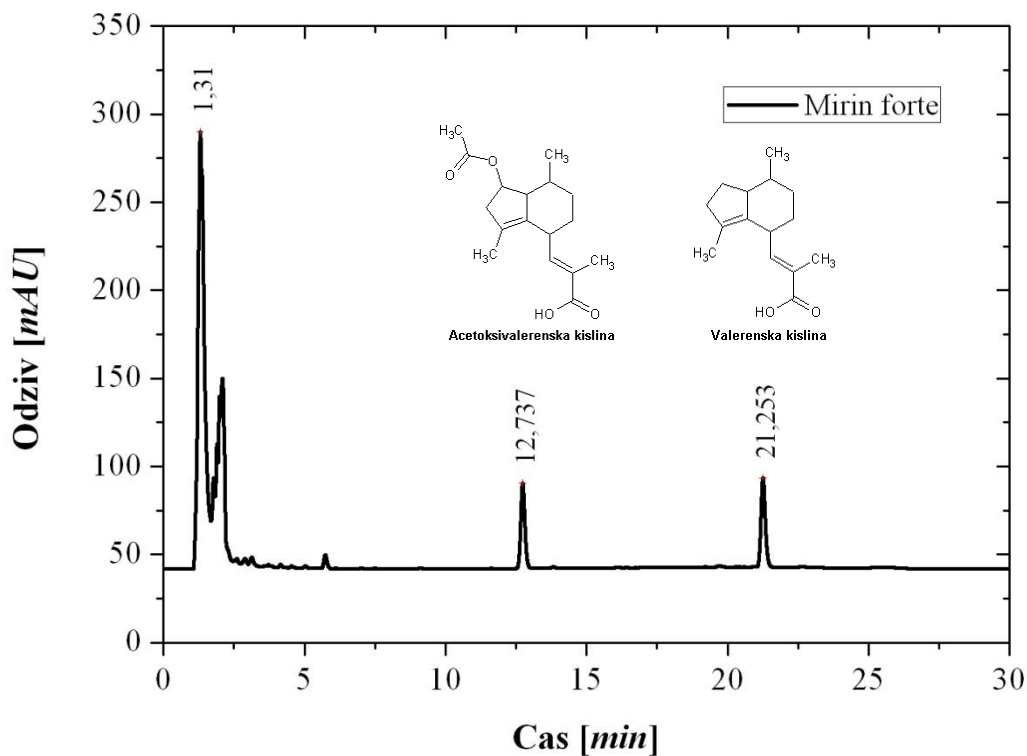
Preglednica XIV: Rezultati preizkusa čistote vrhov.

	Čistota vrha (PPI)
Acetoksivalerenska kislina	1,18
Valerenska kislina	1,28
Dantron	1,07

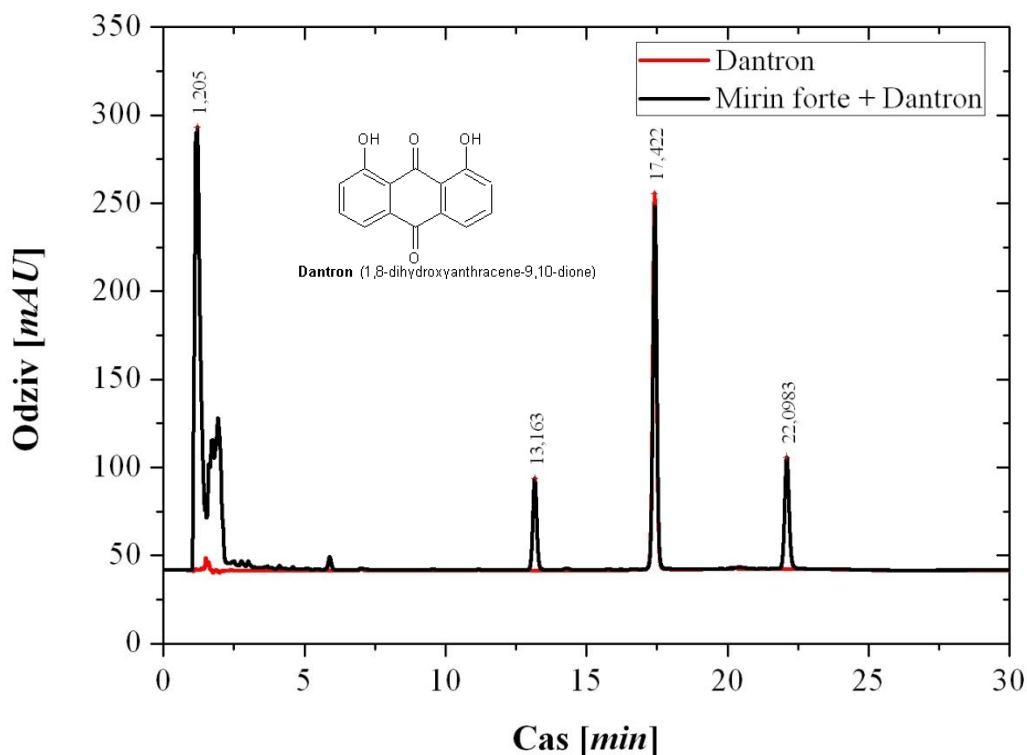
Dobljeni PPI (preglednica XIV) za vse vrhove so znotraj v poglavju 1.4.3 postavljenega kriterija, intervala 1,00-1,50, zato lahko zaključimo, da je naša metoda ustrezno specifična.

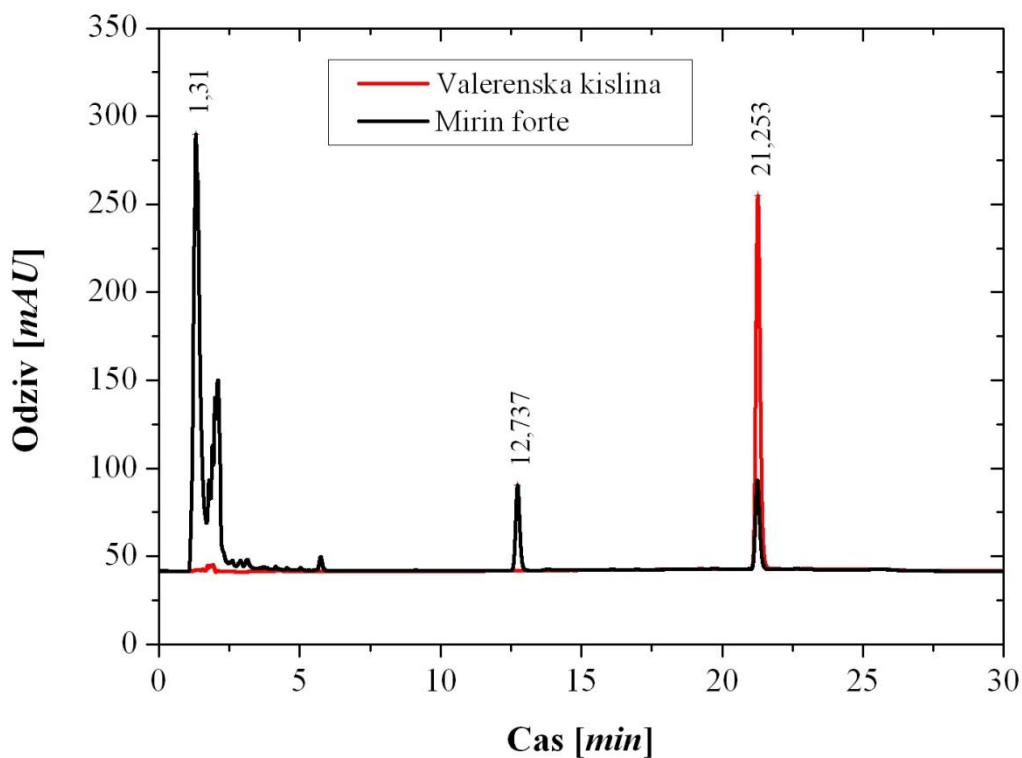
4.3.4 Selektivnost

Zaradi prisotnosti velikega števila spojin in njihovih razpadnih produktov v drogi *Valerianae radix* smo se pri testiranju selektivnosti metode omejili na devet spojin (3.1.1, vse razen dantrona), ki naj bi se nahajale v preiskovani drogi in posneli njihove kromatograme. Za primerjavo smo posneli tudi kromatograme Mirin baldrijanovih kapljic forte brez (slika 14) in z dodatkom dantrona (slika 15) ter kromatogram neoficinalnega standarda valerenske kisline, ki smo ga dodali vzorčni raztopini Mirin baldrijanovih kapljic forte (slika 16).

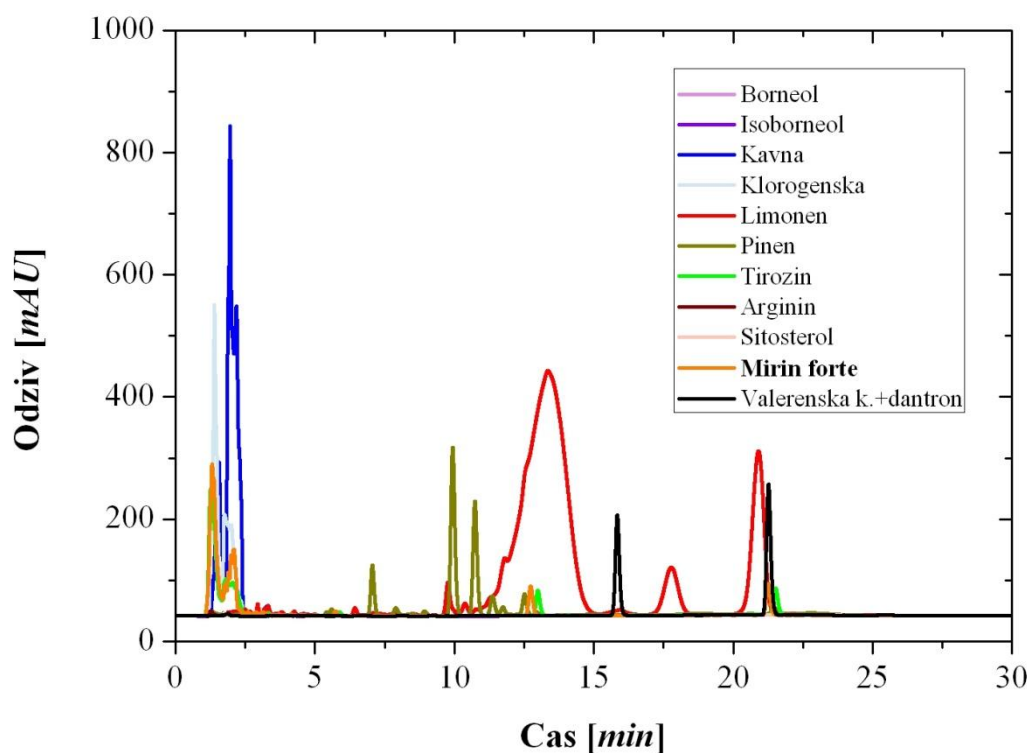


Slika 14: Kromatogram razt. Mirin baldrijanove kapljice forte.

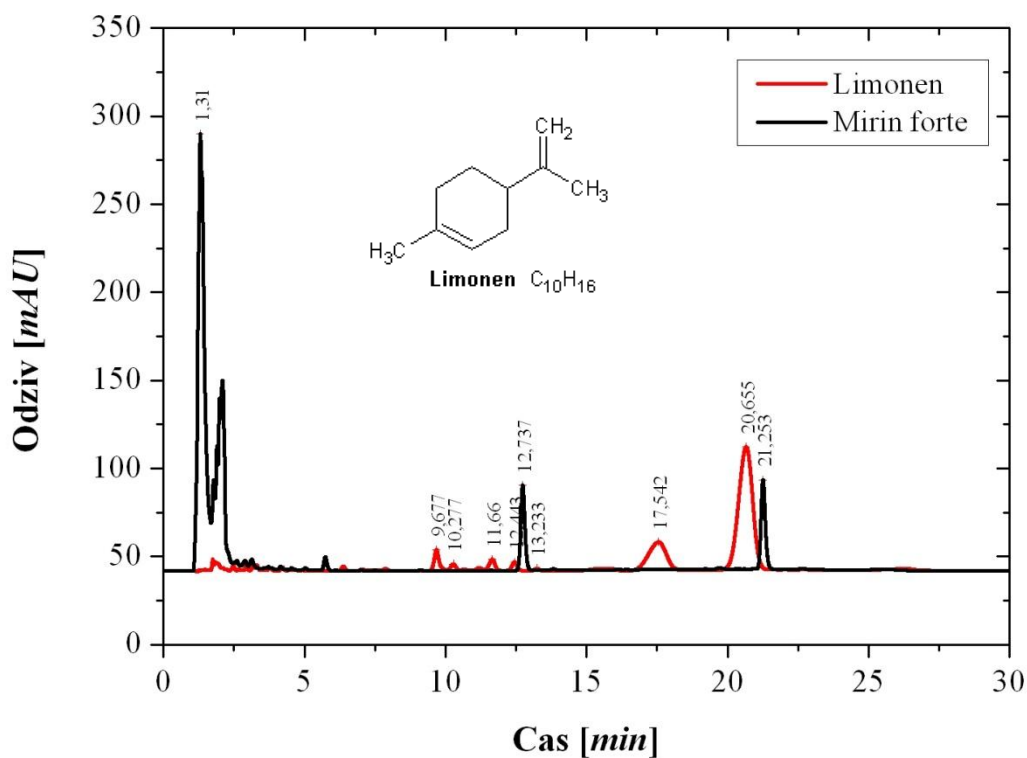
Slika 15: Kromatogram razt. Mirin baldrijanove kapljice forte in 30 mg/L ($4,79 \times 10^{-3}$ mol/L) razt. standarda dantrona.



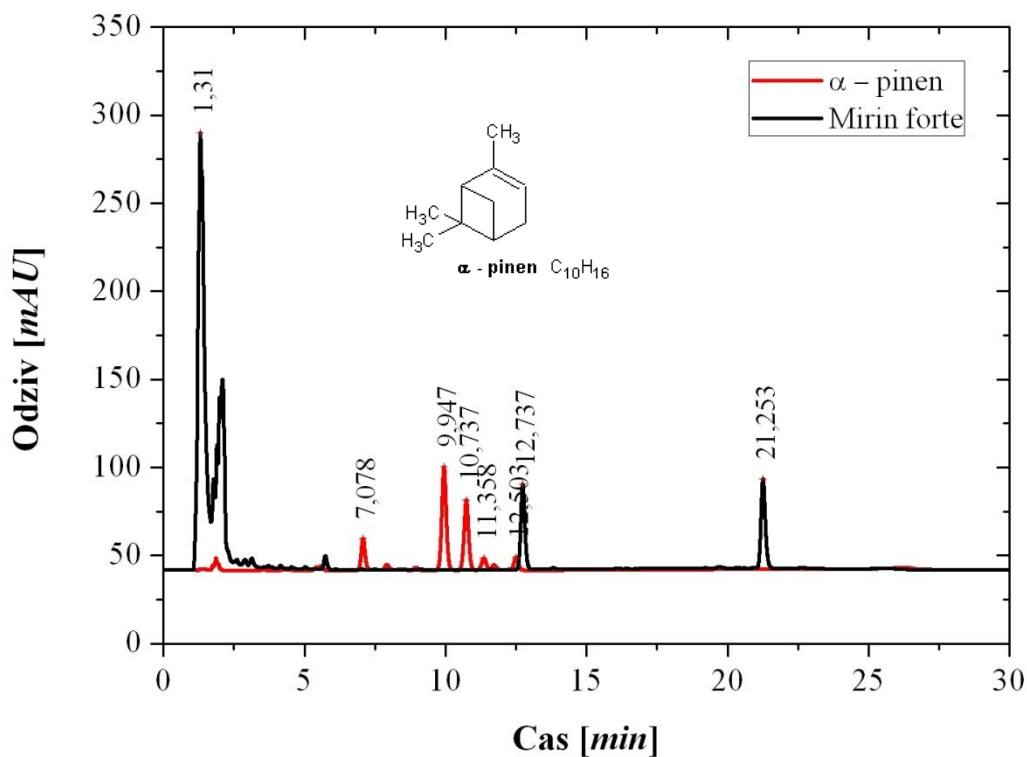
Slika 16: Kromatogram razt. Mirin baldrijanove kapljice forte in 100 mg/L ($4,27 \times 10^{-4}$ mol/L) razt. valerenske kisline.



Slika 17: Kromatogrami vseh koncentriranih (500 mg/L) razt. spojin, uporabljenih pri preizkusu selektivnosti metode.



Slika 18: Kromatogram razt. Mirin baldrijanove kapljice forte in 1563 mg/L (0,01 mol/L) razt. limonena.



Slika 19: Kromatogram razt. Mirin baldrijanove kapljice forte in 1646 mg/L (0,01 mol/L) razt. α-pinena.

Iz kromatogramov vzorčne raztopine Mirin baldrijanove kapljice forte in standarda valerenske kisline (slika 16) je razvidno, da vrh pri približno 21 min res pripada valerenski kislini (VA). Ob primerjavi kromatogramov vzorca (slika 14) in vzorca z dodatkom dantrona (slika 15) vidimo, da vrh pri približno 17 min pripada dantronu in da so vsi vrhovi vizualno ustrezno ločeni med seboj. Glede na to, da poznamo relativni retencijski čas dantrona, pa lahko s pomočjo monografije o korenini baldrijana v Ph. Eur. 5 (9) izračunamo tudi relativni retencijski čas acetoksivalerenske kisline (AVA). Relativni retencijski čas dantrona smo tako pomožili s faktorjem 0,7 in dobili približno 12 min, zato lahko sklepamo, da vrh pri 12 minutah v kromatogramu vzorčne raztopine pripada AVA. Iz slike 17 lahko vidimo, da se v bližini za nas pomembnih vrhov AVA, VA in dantrona nahajajo vrhovi koncentriranih raztopin (naslov Selektivnost v poglavju 3.2.6) limonena, α -pinena in tirozina. Ker razredčene raztopine tirozina aparat ni več zaznal, vpliva tirozina na selektivnost zaznave vrhov nismo raziskovali naprej. Nasprotno pa velja za limonen in α -pinen, zato smo še enkrat posneli kromatograme in ugotovili, da ima limonen (slika 18) vrhove tako v bližini vrha AVA kot v bližini vrha VA, medtem ko bi prisotnost α -pinena (slika 19) lahko prispevala k nepravilni zaznavi in vrednotenju vrha AVA (razlog za tako veliko vrhov pri limonenu in α -pinena bi lahko bila onečiščenost obeh standardov, medtem ko najbrž ne gre za zaznavo kiralnosti spojin, saj delamo z nekiralno kolono). Iz literature (4) smo pridobili podatke, da baldrijanova droga vsebuje 0,1 – 0,6% eteričnega olja, ki naj bi vsebovalo 1 – 2% limonena in 6,76% α -pinena. Glede na te podatke smo preračunali, kolikšni bi bili dejanski masni koncentraciji teh dveh spojin v 1 mL pripravka Mirin baldrijanove kapljice forte in kakšen odziv bi ti izračunani koncentraciji dali (preglednica XV). Ugotovili smo, da bi obe spojini v raztopini Mirin baldrijanove kapljice forte imeli zanemarljiv odziv glede na odziv VA in AVA iz te raztopine. Zato lahko tudi vpliv limonena in α -pinena na selektivnost metode izključimo.

Preglednica XV: Primerjava odzivov limonena in α -pinena v standardni in vzorčni raztopini glede na koncentracijo.

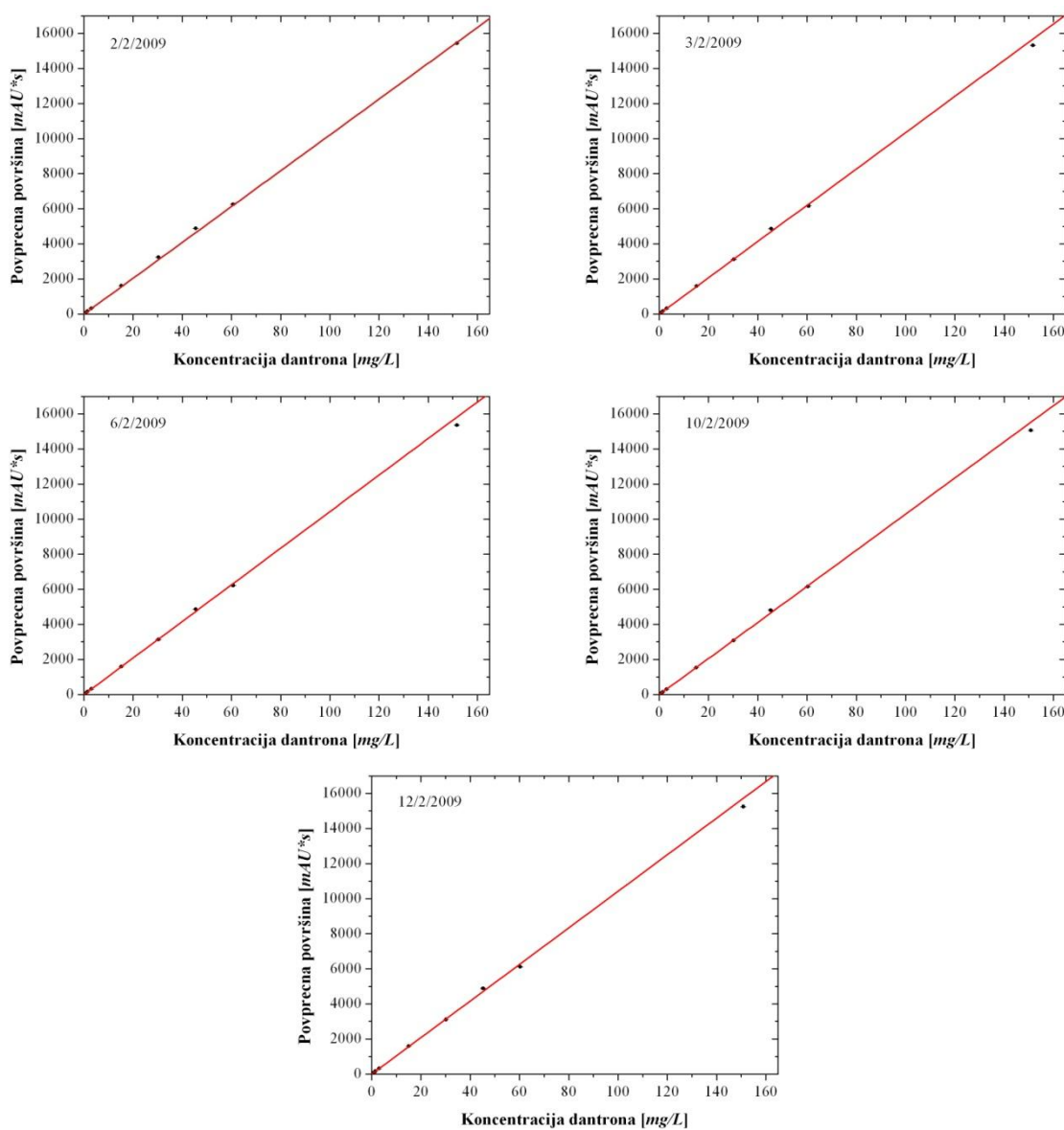
	Konc. v STD [mg/mL]	Odziv [mAU]		Konc. v raztopini vzorca [mg/mL]	Odziv [mAU]
Limonen	1,56	60	Limonen	0,0024	0,092
α - pinen	1,64	6,5	α - pinen	0,0081	0,032

4.3.5 Linearnost

Linearnost metode smo preverili na območju med 0,15 mg/L in 150 mg/L, z devetimi različnimi koncentracijami standarda dantrona (3.2.6).

Preglednica XVI: Enačbe premic linearne regresije in R^2 za vsak dan preizkusa linearnosti.

DAN	NAKLON	PRESEČIŠČE [mAU*s]	R^2
1	102,10	2,32	0,9998
2	103,39	1,93	0,9996
3	104,26	1,11	0,9998
4	102,93	3,06	0,9994
5	104,18	0,75	0,9997



Slika 20: Grafični prikaz linearnosti za vsak dan preizkusa posebej.

Glede na dobljene determinacijske koeficiente R^2 (preglednica XVI), ki so vsi $> 0,99$ lahko potrdimo, da je metoda linearna, kar je razvidno tudi iz grafičnih prikazov posameznih dni (slika 20). Hkrati je območje linearnosti metode dovolj široko, da zagotavlja ustreznost rezultatov tudi pri testiranju nestandardizirane droge.

4.3.6 Natančnost

Ponovljivost znotraj dneva

Pri vrednotenju ponovljivosti metode znotraj dneva smo dobili naslednje rezultate (preglednica XVII):

Preglednica XVII: Rezultati preizkusa ponovljivosti znotraj dneva za raztopine treh različnih koncentracij dantrona.

Konc. [mg/L]	Povprečna AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %
15,05	1646,05	1,48	0,09
30,09	3178,86	3,50	0,11
45,14	4890,88	3,91	0,08

iz katerih je razvidno, da je metoda v validaciji ponovljiva tudi znotraj dneva, saj so vsi RSD manjši od 0,15%, kar ustreza v poglavju 1.4.5 postavljenemu kriteriju.

Ponovljivost znotraj laboratorija

Posneli smo kromatograme in s pomočjo relativnih standardnih odklonov (RSD%) ocenjevali ponovljivost metode znotraj laboratorija (preglednici XVIII in XIX).



Preglednica XVIII: Vrednosti povprečne AUC, SD in RSD ponovljivosti znotraj laboratorija za standardno raztopino dantrona.

1. dan				2. dan				3. dan			
Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %	Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %	Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %
3,0	325,93	0,68	0,21	3,0	319,81	0,16	0,05	3,0	320,62	0,29	0,09
15,2	1609,64	1,29	0,08	15,2	1595,49	1,91	0,12	15,2	1587,92	0,79	0,05
30,4	3237,24	7,12	0,22	30,4	3119,12	4,68	0,15	30,4	3137,32	4,39	0,14
45,5	4882,42	6,84	0,14	45,5	4871,08	12,66	0,26	45,5	4855,13	8,25	0,17
60,7	6254,00	5,63	0,09	60,7	6162,97	3,70	0,06	60,7	6222,04	7,47	0,12

4. dan				5. dan				6. dan			
Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %	Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %	Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %
3,0	302,09	0,27	0,09	3,0	314,80	0,47	0,15	3,0	307,89	0,65	0,21
15,1	1526,39	0,76	0,05	15,1	1588,13	0,79	0,05	15,1	1543,95	0,46	0,03
30,2	3084,29	1,54	0,05	30,2	3108,91	3,42	0,11	30,3	3109,87	16,17	0,52
45,3	4808,65	2,40	0,05	45,3	4888,56	17,60	0,36	45,4	4840,26	5,81	0,12
60,3	6151,15	13,53	0,22	60,3	6111,97	11,00	0,18	60,6	6267,52	2,51	0,04

7. dan				8. dan				9. dan			
Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %	Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %	Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %
3,0	314,94	0,41	0,13	3,0	322,21	0,81	0,25	3,0	316,74	0,41	0,13
15,1	1592,14	1,11	0,07	15,2	1595,53	1,60	0,10	15,2	1597,16	11,66	0,73
30,3	3104,63	2,48	0,08	30,3	3143,80	2,20	0,07	30,3	3121,92	0,94	0,03
45,4	4836,44	5,80	0,12	45,5	4853,23	2,91	0,06	45,5	4822,78	2,41	0,05
60,6	6290,28	8,18	0,13	60,6	6330,12	4,43	0,07	60,6	6259,67	3,13	0,05

10. dan			
Konc. [mg/L]	Povp. AUC [mAU*s]	SD [mAU*s]	RSD %
3,0	322,01	0,71	0,22
15,2	1625,35	1,14	0,07
30,3	3135,85	3,14	0,10
45,5	4855,26	5,34	0,11
60,6	6187,30	3,09	0,05

Preglednica XIX: Povprečne vrednosti povprečne AUC, standardna napaka in RSE meritev vseh dni preizkusa ponovljivosti metode znotraj laboratorija.

Konc. [mg/L]	Povprečje povprečne AUC [mAU*s]	Standardna napaka [mAU*s]	RSE %
3,0	316,70	6,83	2,16
15,1	1586,17	27,89	1,76
30,3	3130,30	39,43	1,26
45,4	4851,38	24,00	0,49
60,6	6223,70	65,31	1,05



RSD% iz preglednice XVIII so znotraj posameznega dneva vsi manjši od 1%, hkrati pa so vse RSE% (preglednica XIX) pod 2,5%, s čimer smo glede na v poglavju 1.4.5 postavljen kriterij dokazali, da je naša metoda znotraj laboratorija ustrezno ponovljiva. Metoda je na spodnji meji, t.j. pri koncentraciji dantrona 3,0 mg/L, najmanj ponovljiva, saj znaša RSE 2,16%.

4.3.7 Točnost

Po postopku, opisanem v poglavju 3.2.6, smo pripravili potrebne raztopine, posneli kromatogramе in rezultate vrednotili s pomočjo razmerja med izmerjeno in dodano koncentracijo standarda dantrona (1.4.6), kot je prikazano v preglednici XX.

Preglednica XX: Podatki in izračuni pri preizkusu točnosti metode za standardno raztopino dantrona.

DAN 1			
Željena vrednost	Dodana konc. STD [mg / L]	Izmerjena konc. STD [mg / L]	Razmerje [%]
50%	15,04	15,10	100,40
75%	22,55	22,96	101,82
100%	30,07	30,27	100,67
125%	37,59	38,23	101,70
150%	45,11	45,24	100,30
Povprečna točnost:	100,98		
Standardna deviacija:	0,73		100,98 ± 0,73
RSD %:	0,72		

DAN 2			
Željena vrednost	Dodana konc. STD [mg / L]	Izmerjena konc. STD [mg / L]	Razmerje [%]
50%	15,09	15,42	102,19
75%	22,64	22,56	99,67
100%	30,18	30,09	99,70
125%	37,73	39,24	104,02
150%	45,27	44,65	98,63
Povprečna točnost:	100,84		
Standardna deviacija:	2,21		100,84 ± 2,21
RSD %:	2,19		

DAN 3			
Željena vrednost	Dodana konc. STD [mg / L]	Izmerjena konc. STD [mg / L]	Razmerje [%]
50%	15,15	15,19	100,26
75%	22,73	22,73	100,02
100%	30,30	30,10	99,34
125%	37,88	38,36	101,28
150%	45,45	44,93	98,86
Povprečna točnost:	99,95		
Standardna deviacija:	0,93		99,95 ± 0,93
RSD %:	0,93		



Iz rezultatov je razvidno, da je metoda točna, saj so intervali rezultatov vseh treh dni znotraj zastavljenega intervala, t.j. 95 – 105% pričakovane koncentracije.

4.3.8 Delovno območje

S pomočjo podatkov iz analize linearnosti metode in izračuna meje kvantifikacije smo delovno območje omejili na interval od 0,3 mg/L do 150 mg/L, kar ustreza koncentracijskemu intervalu 1% - 500% testne koncentracije. Ustrezno ponovljivost metode smo pokazali v intervali koncentracij 10 – 200%, ustrezno točnost pa v intervalu 50 – 150% testne koncentracije. To pomeni, da je naša metoda linearna, ponovljiva in točna v območju 50 – 150% testne koncentracije (t.j. 30 mg/L), zato je ta interval naše delovno območje. Dobljen interval ustreza v poglavju 1.4.7 postavljenemu kriteriju.

4.3.9 Robustnost

Vzorce in standarde za preizkus robustnosti smo pripravili po opisu pod naslovom Robustnost v poglavju 3.2.6. Za vsakega izmed kromatografskih pogojev smo iz dobljenih rezultatov po enačbah 9 in 10 za VZ1 izračunali deleže odstopanja površine in retencijskega časa (t_r) od rezultatov izbrane reference. Po enakih enačbah smo delali tudi pri VZ2, le da smo tukaj uporabili podatke, dobljene iz analize raztopine, ki je hkrati vsebovala vzorec in standard (tak vzorec smo analizirali zato, da smo preverili, ali dodatek dantrona k raztopini Mirin baldrijanovih kapljic forte vpliva na površino ali retencijski čas vrhov AVA in VA ter da hkrati prisotnost slednjih ne vpliva na površino ali retencijski čas vrha dantrona).

Negativni predznak izračunanih deležev odstopanja tako glede na enačbi 9 in 10 pomeni zmanjšanje razmerja površin oziroma krajše retencijske čase spojin glede na referenčno razmerje površin oziroma referenčni retencijski čas.

Vpliv spremembe temperature kolone

Vpliv spremembe temperature kolone na % odstopanja AUC in t_r AVA, VA ter dantrona je razviden iz preglednice XXI.

Preglednica XXI: Vpliv temperature na površino in retencijski čas spojin.

ODSTOPANJE RAZMERJA POVRŠIN [%]			ODSTOPANJE RETENCIJSKIH ČASOV [%]			
	AVA	VA		AVA	VA	DANTRON
	24 ⁰ C	24 ⁰ C		24 ⁰ C	24 ⁰ C	24 ⁰ C
VZ1&STD	0,52	0,16	VZ1&STD	-0,04	0,21	1,03
VZ2	0,28	-0,38	VZ2	-0,02	0,25	0,20
	26 ⁰ C	26 ⁰ C		26 ⁰ C	26 ⁰ C	26 ⁰ C
VZ1&STD	0,31	0,47	VZ1&STD	-0,85	-0,67	-0,28
VZ2	-0,44	-0,11	VZ2	-0,60	-0,45	-1,00

Odstotek odstopanja smo izračunali glede na referenčno razmerje med VZ in STD, dobljeno pri 25 °C. Iz rezultatov je razvidno, da je odstopanje povsod manjše od 1%. Pri vrednotenju odstopanja retencijskih časov od referenčnega časa pri 26 °C opazimo negativni trend, iz česar lahko sklepamo, da pri povišani temperaturi obe spojini in dantron hitreje pripotujejo do detektorja. To ugotovitev bi lahko uporabili za utemeljitev dela pri bolj povišani temperaturi, kar bi najbrž skrajšalo čas analize.

Vpliv spremembe hitrosti pretoka mobilne faze

Iz preglednice XXII je razvidno, kako različne hitrosti pretoka vplivajo na % odstopanja AUC in t_r AVA, VA ter dantrona.

Preglednica XXII: Vpliv hitrosti pretoka MF na površino in retencijski čas spojin.

ODSTOPANJE RAZMERJA POVRŠIN [%]			ODSTOPANJE RETENCIJSKIH ČASOV [%]			
	AVA	VA		AVA	VA	DANTRON
	1,4 mL/min	1,4 mL/min		1,4 mL/min	1,4 mL/min	1,4 mL/min
VZ1&STD	-0,26	2,60	VZ1&STD	4,56	3,43	4,29
VZ2	-0,49	4,41	VZ2	4,74	3,56	4,36
	1,6 mL/min	1,6 mL/min		1,6 mL/min	1,6 mL/min	1,6 mL/min
VZ1&STD	-0,12	-2,26	VZ1&STD	-4,35	-3,16	-4,06
VZ2	-0,43	-0,22	VZ2	-4,33	-3,14	-4,03

Vpliv spremembe hitrosti pretoka mobilne faze smo vrednotili z odstotki odstopanja od referenčnega razmerja med VZ in STD, dobljenega pri pretoku 1,5 mL/min. Pri vrednotenju sprememb v površini lahko opazimo, da se površina acetoksivalerenske kisline glede na površino STD minimalno spreminja, razmerja odstopajo od referenčnega za največ 0,5%. Drugače pa je pri valerenski kislini, kjer se razmerje pri nižji hitrosti pretoka za oba VZ glede na referenčno razmerje poveča za največ 5%, pri višji hitrosti pa zmanjša

za največ 2,26%. Iz tega lahko zaključimo, da sprememba pretoka vpliva na prehod valerenske kisline preko detektorske celice. Razmerja retencijskih časov kažejo, da je t_r spojin odvisen od hitrosti pretoka, vendar so trendi spreminjanja t_r takšni kot jih pričakujemo.

Vpliv spremembe koncentracije fosforjeve kisline v mobilni fazi

Vpliv spremembe pH mobilne faze na % odstopanja AUC in t_r AVA, VA ter dantrona je prikazan v preglednici XXIII.

Preglednica XXIII: Vpliv koncentracije fosforjeve kisline na površino in retencijski čas spojin.

ODSTOPANJE RAZMERJA POVRŠIN [%]			ODSTOPANJE RETENCIJSKIH ČASOV [%]			
	AVA	VA		AVA	VA	DANTRON
	4,5 g/L	4,5 g/L		4,5 g/L	4,5 g/L	4,5 g/L
VZ1&STD	0,25	0,14	VZ1&STD	0,02	-0,68	-0,23
VZ2	0,03	-0,17	VZ2	0,00	-0,69	-0,26
	5,5 g/L	5,5 g/L		5,5 g/L	5,5 g/L	5,5 g/L
VZ1&STD	-0,18	-0,14	VZ1&STD	-0,53	-0,35	-0,43
VZ2	0,02	-0,02	VZ2	-0,72	-0,46	-0,57

Referenčno razmerje za ovrednotenje vpliva sprememb koncentracije fosforjeve kisline v mobilni fazi je razmerje med VZ in STD, dobljeno pri koncentraciji fosforjeve kisline 5,0 g/L. Iz dobljenih vrednosti odstotka odstopanja, ki so vse manjše kot 1%, lahko zaključimo, da preizkušena sprememba pH mobilne faze ne vpliva pomembno na rezultate analize VZ in STD.

Vpliv spremembe serije in proizvajalca kolone

Serijska in proizvajalec kolone vplivata na % odstopanja AUC in t_r AVA, VA ter dantrona tako, kot je prikazano v preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: Vpliv serije in proizvajalca kolone na površino in retencijski čas spojin.

ODSTOPANJE RAZMERJA POVRŠIN [%]			ODSTOPANJE RETENCIJSKIH ČASOV [%]			
	AVA	VA		AVA	VA	DANTRON
	Phenomenex	Phenomenex		Phenomenex	Phenomenex	Phenomenex
VZ1&STD	-4,75	-5,03	VZ1&STD	-0,51	-1,05	-0,95
VZ2	-0,80	-1,12	VZ2	-0,41	-0,96	-1,09
	PerkinElmer	PerkinElmer		PerkinElmer	PerkinElmer	PerkinElmer
VZ1&STD	-5,49	-3,12	VZ1&STD	1,25	2,88	8,48
VZ2	-0,86	1,12	VZ2	1,32	2,91	8,48

Kot referenčno kolono smo uporabili kolono Luna proizvajalca Phenomenex serijske številke 431986-15 (preglednica I v poglavju 3.1.4). Iz dobljenih vrednosti je razvidno, da

je vpliv na površino enak pri uporabi kolone z drugo serijsko številko in kolone drugega proizvajalca, medtem ko sprememba kolone bolj vpliva na razmerje retencijskih časov spojin. Vpliv kolone druge serije na retencijski čas je minimalen, kolona drugega proizvajalca pa opazno podaljša retencijske čase vseh spojin, predvsem dantrona. Takšna enostranska sprememba bi lahko vodila do napačnega izračuna vsebnosti seskviterpenskimi kislin. Zaradi slednjega bomo v praksi uporabljali kolone Luna proizvajalca Phenomenex.

Vpliv spremembe valovne dolžine detekcije

Vpliv spreminjanja valovne dolžine detekcije na % odstopanja AUC in t_r AVA, VA ter dantrona je prikazan v preglednici XXV.

Preglednica XXV: Vpliv valovne dolžine detekcije na površino in retencijski čas spojin.

ODSTOPANJE RAZMERJA POVRŠIN [%]			ODSTOPANJE RETENCIJSKIH ČASOV [%]			
	AVA	VA		AVA	VA	DANTRON
	218 nm	218 nm		218 nm	218 nm	218 nm
VZ1&STD	12,83	13,47	VZ1&STD	-0,04	-0,07	-0,13
VZ2	12,36	13,01	VZ2	-0,05	-0,06	-0,16
	219 nm	219 nm		219 nm	219 nm	219 nm
VZ1&STD	5,79	5,95	VZ1&STD	-0,06	-0,05	-0,11
VZ2	5,67	6,47	VZ2	-0,09	-0,10	-0,19
	221 nm	221 nm		221 nm	221 nm	221 nm
VZ1&STD	-5,07	-5,26	VZ1&STD	0,02	0,02	0,06
VZ2	-4,76	-4,69	VZ2	0,02	0,02	0,06
	222 nm	222 nm		222 nm	222 nm	222 nm
VZ1&STD	-8,51	-8,63	VZ1&STD	-0,07	-0,06	-0,07
VZ2	-8,29	-8,58	VZ2	-0,25	-0,11	-0,24

Vpliv spremembe valovne dolžine detekcije smo preizkušali glede na razmerje VZ/STD pri valovni dolžini 220 nm. Iz odstotkov odstopanja od referenčne vrednosti lahko razberemo, da sprememba valovne dolžine pomembno vpliva na razmerje površin vrhov VZ in STD, saj so vseh sprememb večje od 4,5%. Nasprotno pa so odstotki odstopanja razmerij retencijskega časa vsi manjši od 0,5%, iz česar lahko sklepamo, da sprememba valovne dolžine detekcije nima opaznega vpliva na čas potovanja spojin preko kolone.

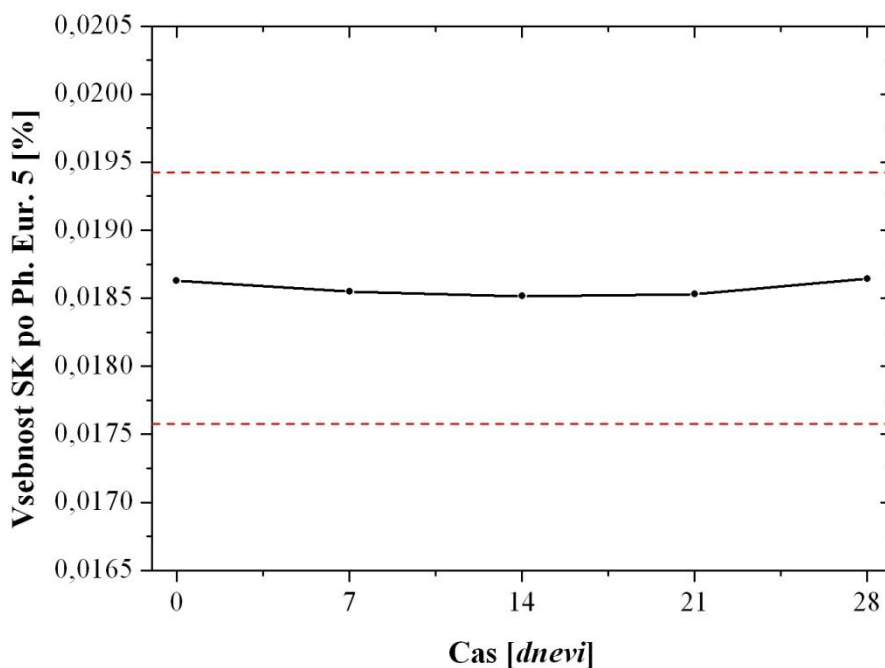
4.4 Pospešena stabilnostna študija

Pospešeno stabilnostno študijo izdelkov Mirin baldrijanove kapljice in Mirin baldrijanove kapljice forte smo izvedli po opisu v poglavju 3.2.7. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXVI ter na slikah 21 in 22.

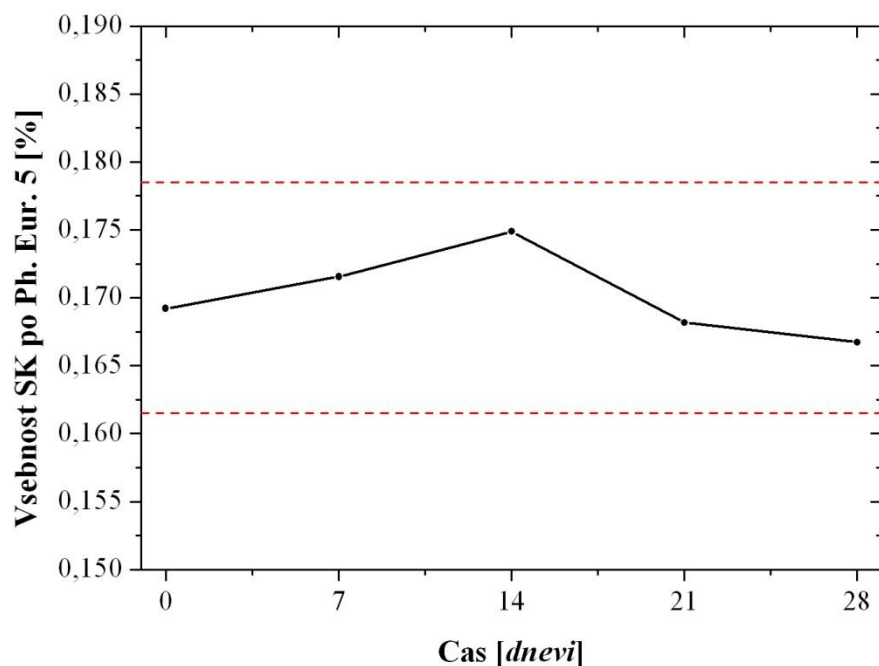
Preglednica XXVI: Rezultati štiri tedenske pospešene stabilnostne študije na izdelkih iz baldrijana Javnega zavoda Mariborskih lekarn.

Mirin baldrijanove kapljice Mirin baldrijanove kapljice forte

Čas [dni]	Vsebnost SK [%]	Čas [dni]	Vsebnost SK [%]
0	0,019	0	0,17
7	0,019	7	0,17
14	0,019	14	0,17
21	0,019	21	0,17
28	0,019	28	0,17



Slika 21: Grafični prikaz spreminjanja vsebnosti seskviterpenskikh kislin v izdelku Mirin baldrijanove kapljice med 28 dnevno pospešeno stabilnostno študijo.



Slika 22: Grafični prikaz spreminjanja vsebnosti seskviterpenskkih kislin v izdelku Mirin baldrijanove kapljice forte med 28 dnevno pospešeno stabilnostno študijo.

Pospešene stabilnostne študije nismo opravili kot predpisuje smernica ICH Q1A (22), saj bi potem študija morala trajati 6 mesecev (analize vzorcev ob časih 0, 3 in 6 mesecev), kar pa v našem primeru zaradi časovne omejenosti dela na aparaturi ni bilo možno. Zaradi kratkotrajnosti naše študije nismo ekstrapolirali premice in preverjali roka uporabnosti, saj je obdobje enega meseca za te postopke prekratko. Osredotočili smo se na nihanje vsebnosti seskviterpenskkih kislin v izbranih izdelkih Javnega zavoda Mariborskih lekarn v roku 28 dni, ki smo ga izračunali po enačbi 11 iz poglavja 3.2.7.

Dobljene vrednosti in grafične predstavitev so pokazale, da je vsebnost seskviterpenskkih kislin v preizkušanih pripravkih iz baldrijana v roku enega meseca ustrezna, kajti nobena vrednost ni izven za nas pomembnega intervala, t.j. 95 – 105% izračunane povprečne vsebnosti. Ustreznost raztopin smo dokazali glede na farmakopejske zahteve za odstotek vsebnosti seskviterpenskkih kislin. Ph. Eur. 5 namreč za drogo korenine baldrijana predpisuje, da odstotek vsebnosti SK v drogi ne sme biti manj kot 0,17%, Ph. Eur. 6 pa za baldrijanovo tinkturo predpisuje, da mora biti odstotek vsebnosti SK najmanj 0,015%. Glede na z mesečno pospešeno študijo dobljene rezultate droga, iz katere je bil dobljen ekstrakt za Mirin baldrijanove kapljice forte, ustreza predpisu v Ph. Eur. 5, tinktura Mirin baldrijanove kapljice pa predpisu v Ph. Eur. 6.

5 SKLEP

Validirali smo analizno metodo za ugotavljanje vsebnosti seskviterpenskimi kislin v drogi korenine zdravilne špajke, ki jo predpisuje Ph. Eur. 5.

Preizkusa stabilnosti standardne raztopine sta pokazala, da je raztopina stabilna znotraj 24 ur in petih dni, kar pomeni, da ni potrebno vsak dan analize pripravljati nove standardne raztopine, kar smo izkoristili med validacijo metode. Za uporabo metode v praksi pa je pomembna samo znotraj dnevna stabilnost dantrona, saj analiza izdelkov ne bo trajala več kot en dan.

Na osnovi rezultatov dela lahko zaključimo, da je obravnavana analizna metoda specifična, selektivna, linearna, natančna in točna v delovnem območje med 50 – 150% testne koncentracije. Izračun meje zaznavnosti in določljivosti je pokazal, da je metoda najbrž sposobna zaznati in določiti zelo nizke koncentracije standardne raztopine. Hkrati smo pri preizkusu robustnosti metode ugotovili, da spremembi temperature in pH mobilne faze nimata večjega vpliva na rezultate analize, medtem ko to za hitrost pretoka mobilne faze, valovno dolžino in proizvajalca kolone ne velja. Zato bomo morali pri rutinskem delu v kontrolno-analiznem laboratoriju paziti, da bomo izdelke iz baldrijana preizkušali s Phenomenex Luna kolono pri v monografiji za drogo korenine baldrijana v Ph. Eur. 5 (9) predpisanem pretoku in valovni dolžini.

Izvedena pospešena stabilnostna študija je pokazala, da so izdelki glede na vsebnost seskviterpenskimi kislin stabilni v izbranem časovnem obdobju. To dejstvo bi lahko vodilo do ideje o podaljšanju roka uporabnosti izdelka, zato bi bilo predvsem iz ekonomskega vidika smiselno opraviti dolgotrajno (vsaj 12 mesečno) stabilnostno študijo pri normalnih pogojih (25 °C/60% RH) shranjevanja. Za namene rutinskega dela bi lahko podali tudi vsebnost seskviterpenskimi kislin na predpisan odmerik pripravka.

V prihodnje bi lahko raziskali še vpliv večjih sprememb temperature na izvedbo metode, saj bi delo pri višjih temperaturah (na primer 40 °C) najbrž skrajšalo čas analize.



6 LITERATURA

- 1 Martinčič A, Wraber T, Jogan N, et al: **Mala flora Slovenije**. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana 2007: 493-497
- 2 Umek A: **Farmakognozija. Osnove botanike. Droge**. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1987: 136-138
- 3 Toplak Galle K: **Zdravilne rastline na Slovenskem**. Mladinska knjiga, Ljubljana 2000: 46-47
- 4 American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium: **Valerian Root**. Santa Cruz 1999 (<http://www.herbal-ahp.org/documents/sample/valerian.pdf>) – dostopano april 2009
- 5 **WHO monographs on selected plants. Volume 1**. World Health Organization, Geneva 1999: 267-276
- 6 **E/S/C/O/P MONOGRAPHS. 2nd ed.**. ESCOP, Thieme, Stuttgart 2003: 539 - 545
- 7 Chevallier A: **Enciklopedija zdravilnih rastlin**. DZS, Ljubljana 1998: 146
- 8 Rode J: **Zeliščni vrt. Domača lekarna**. Kmečki glas, Ljubljana 2004: 65-67
- 9 **European Pharmacopoeia. 5th ed. Volume 1. Volume 2**. Council of Europe, Strasbourg 2004: 43-44; 69-73, 2667-2668 (1/2005:0453)
- 10 **European Pharmacopoeia. 6th ed. Volume 2**. Council of Europe, Strasbourg 2008: 3174 – 3176 (1/2008:1899)
- 11 Žorž M: **HPLC**. Samozaložba, Ljubljana 1991
- 12 Rouessac F, Rouessac A: **Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques. 2nd ed.**. J. Wiley & Sons Ltd., Chichester 2007: 63-88
- 13 ICH guideline Q2(R1): **Validation of analytical procedures: Text and Methodology**. November 2005
- 14 Skoog D. A.: **Principles of Instrumental Analysis. 5th ed.**. Saunders College Publishing, USA 1998: 725-769
- 15 Huber L: **Validation of Analytical Methods: Review and Strategy**. LabCompliance, 2001
- 16 Huber L: **Validation of HPLC Methods**. LabCompliance, 2001
- 17 Pabst G: **Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen**



- Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. Volume 1.** Th. Schäfer, Edition Libri Rari, Hannover 1997: 47
- 18 **Zbornik referatov 6. Posvetovanja farmacevtskih tehnologov: Validacija v proizvodnji zdravil.** Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 16. junij 1994: 7-17, 97-114
- 19 **EMA. Community herbal monograph on *Valeriana officinalis* L., radix.** Committee on herbal medicinal products (HMPC), London, 26. Oktober 2006 (http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/hmpc/valeriana_radix/34071905fin.pdf) – dostopano septembra 2009
- 20 **Iris - HPLC Spectral Processing Software.** PerkinElmer, ZDA, Julij 2006: 350-351
- 21 **Luna HPLC Brochure.** Phenomenex: 6-7 (<http://www.phenomenex.com/WorkArea/showcontent.aspx?id=11009>) - dostopano oktobra 2009
- 22 **ICH guideline Q1A(R2): Stability testing of new drug substances and products.** 6 februar 2003: 6-13