

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA UCMAN

**OPTIMIZACIJA METODE TANKOPLASTNE KROMATOGRAFIJE
ZA KVANTITATIVNO VREDNOTENJE VSEBNOSTI SORODNIH
SUBSTANC V ZDRAVILNI UČINKOVINI IN FARMACEVTSKEM
IZDELKU**

OPTIMIZATION OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY METHOD
FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF RELATED SUBSTANCES
CONTENT IN THE SELECTED ACTIVE SUBSTANCE IN
PHARMACEUTICAL PRODUCT

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo sem opravljala v laboratorijih tovarne Krka, d. d., v Službi za laboratorijsko kontrolo kakovosti, pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja ter somentorstvom mag. Martine Rozman, univ. dipl. kem.

Zahvala

Za strokovno vodstvo in nasvete pri izdelavi magistrske naloge ter usmerjanje pri sodelovanju z industrijo se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Francu Vrečerju. Najlepša hvala tudi somentorici mag. Martini Rozman, univ. dipl. kem., ki je pokazala veliko dobre volje, me podpirala in usmerjala pri mojem raziskovalnem delu.

Hvala tudi vsem, ki so prispevali marsikateri praktični nasvet in s tem pripomogli k boljšemu razumevanju tematike. Zahvaljujem se tudi Vojku Zupančiču in Lidiji Pezdirc za sodelovanje in nasvete pri identifikaciji sorodnih substanc s TLC-MS in LC-MS.

Še posebej se zahvaljujem svojemu partnerju Matjažu Grillu za nesebično pomoč in strokovne nasvete.

Navsezadnje se moram iskreno zahvaliti tudi svoji družini, ki me je ves čas študija moralno podpirala in verjela vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja in somentorice mag. Martine Rozman, univ. dipl. kem.

KAZALO

1.	UVOD.....	1
1.1.	TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC).....	1
1.2.	ZGODOVINA RAZVOJA TLC.....	2
1.3.	TEORETIČNE OSNOVE TLC	3
1.4.	STACIONARNA FAZA IN RAZLIČNE VRSTE ADSORBENTOV	4
1.4.1.	SILIKAGEL	4
1.4.2.	CELULOZA	5
1.4.3.	DRUGI TIPI ADSORBENTOV ZA PRIPRAVO STACIONARNE FAZE ..	6
1.5.	MOBILNA FAZA	7
1.5.1.	ELUCIJSKA MOČ TOPILA	8
1.5.2.	SELEKTIVNOST.....	8
1.6.	NANAŠANJE VZORCEV NA STACIONARNO FAZO	9
1.6.1.	NANAŠANJE RAZTOPIN V TOČKO	10
1.6.2.	NANAŠANJE RAZTOPIN V ČRTICO	10
1.7.	RAZVIJANJE	11
1.8.	KVANTITATIVNO IN KVALITATIVNO VREDNOTENJE KROMATOGRAMOV	12
1.8.1.	UV SVETLOBA	12
1.8.2.	VIDNA SVETLOBA	13
1.8.3.	KVANTITATIVNO VREDNOTENJE KROMATOGRAMOV.....	13
1.9.	SORODNE SUBSTANCE	15
2.	NAMEN DELA.....	16
3.	EKSPERIMENTALNO DELO	17

3.1. MATERIALI	17
3.1.1. UPORABLJENI MATERIALI	17
3.1.2. STEKLOVINA.....	17
3.1.3. TOPILA IN REAGENTI.....	17
3.2. MOBILNA FAZA	17
3.3. METODE DELA	18
3.3.1. UPORABLJENI INSTRUMENTI	18
3.3.2. PRIPRAVA STANDARDOV ZA TLC	18
3.3.3. PRIPRAVA VZORCEV ZA TLC.....	20
3.3.4. NANAŠANJE RAZTOPIN NA STACIONARNO FAZO	22
3.3.5. RAZVIJANJE STACIONARNE FAZE V MOBILNI FAZI	23
3.3.6. KVANTITATIVNO VREDNOTENJE KROMATOGRAMOV (DENZITOMETRIJA)	23
3.4. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	27
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4.1. OPTIMIZACIJA STACIONARNE FAZE.....	28
4.2. OPTIMIZACIJA NANAŠANJA.....	30
4.3. TLC IN HPLC SKLOPLJENA Z MASNIM DETEKTORJEM	30
4.4. KVANTITATIVNO DOLOČEVANJE VSEBNOSTI SORODNIH SUBSTANC V ZDRAVILNI UČINKOVINI.....	33
4.5. KVANTITATIVNO DOLOČEVANJE VSEBNOSTI SORODNIH SUBSTANC V KONČNEM FARMACEVTSKEM IZDELKU	57
4.6. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV – t-TEST PAROV.....	61
5. ZAKLJUČEK	65
6. LITERATURA	67

POVZETEK

Spremembe na področju regulative farmacevtskih surovin in izdelkov, novosti in napredek v instrumentalnih analiznih tehnikah, spremembe zahtev in potreb farmacevtske industrije zahtevajo razvoj novih analiznih metod za potrditev kakovosti zdravilnih učinkovin in končnih farmacevtskih izdelkov. V magistrski nalogi smo se osredotočili na razvoj nove analizne metode za kvantitativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc v izbrani zdravilni učinkovini. Optimizirano analizno metodo smo preizkusili tudi na končnem farmacevtskem izdelku. V Ph. Eur. je kot edina validirana metoda za vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc v izbrani zdravilni učinkovini navedena HPLC metoda. Ker je slednja stroškovno zelo draga in časovno potratna analizna metoda, smo želeli razviti hitrejšo in cenejšo metodo za kvantitativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc s TLC metodo. Večja učinkovitost vrednotenja vzorcev s TLC metodo pa dolgoročno lahko vodi v velike prihranke v farmacevtski industriji.

Za preverjanje optimizirane TLC metode smo uporabili 14 serij zdravilne učinkovine in 6 serij končnega farmacevtskega izdelka. V prvi fazi smo se najprej lotili optimizacije stacionarne faze, s katero smo izboljšali ločbo posameznih komponent vzorca. V naslednji fazi smo optimizirali tudi nanašanje raztopin standardov zdravilne učinkovine in vzorcev na kromatografsko ploščo. Z optimizacijo smo se tako izognili vplivu človeškega faktorja pri nanašanju, ki je lahko eden izmed vzrokov za napačno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc v vzorcu. Po razvijanju kromatografske plošče v izbrani mobilni fazi smo vsako ploščo tudi kvantitativno ovrednotili na denzitometru. Za umeritveno krivuljo smo izbrali polinomsko funkcijo, saj smo imeli na kromatografski plošči nanesene raztopine standarda zdravilne učinkovine v širokem koncentracijskem območju. Naredili smo tudi primerjavo, umeritvene krivulje s polinomsko funkcijo in linearno regresijo. Dokazali smo, da je v našem primeru ustreznejša izbira polinomske funkcije, saj sorodnih substanc v nizkih koncentracijah z linearno regresijo nismo mogli ustrezno vrednotiti. Metodo smo nato preizkusili tudi na končnem farmacevtskem izdelku. Tudi v končnem farmacevtskem izdelku smo lahko kvantificirali vsebnosti sorodnih substanc. Rezultate, dobljene pri HPLC metodi in pri optimizirani TLC metodi za zdravilno učinkovino, smo tudi statistično ovrednotili. Uporabili smo T-test parov, s katerim smo dokazali, da sta metodi med sabo statistično primerljivi in med njima ne obstaja pomembna statistična razlika.

KLJUČNE BESEDE

Tankoplastna kromatografija, kvantitativno vrednotenje, optimizacija metode, polinomska funkcija

ABSTRACT

Changes in the regulation of the pharmaceutical raw materials and products, innovation and progress in instrumental analytical techniques, changes to the requirements and needs of the pharmaceutical industry require the development of new analytical methods for the evaluation of the active substances and finished pharmaceutical products quality. The focus of this master's thesis is on the development of a new analytical method for quantitative determination of related substances content in the selected active substance. The optimized analytical method was tested on the finished pharmaceutical product as well. The Ph. Eur. lists the HPLC method as the only validated method for determination of related substances content in the selected active substance. Since it is a very expensive and time-consuming analytical method, we wanted to develop a faster and cheaper method for quantitative determination of related substances content with the TLC method. Higher efficiency of TLC analysis of samples can in the long term result in substantial cost savings in the pharmaceutical industry.

In order to verify the optimized TLC method, fourteen batches of active substance and six batches of finished pharmaceutical product were used. In the first phase, we first addressed the optimization of the stationary phase, in which we improved the separation of individual components of the sample. In the next phase, we optimized the application of the standard solutions of the active substance and samples on the chromatographic plate. By optimizing the application of sample solution we avoided the influence of the human factor in the application, which can be one of the causes for incorrect determinations of the related substance content in the sample. After the development of the chromatographic plate in the selected mobile phase, each plate was quantitatively evaluated with a densitometer. Polynomial function was chosen for the calibration curve, since we applied the solutions of the standard active pharmaceutical ingredient to the chromatographic plate in a wide concentration range. Calibration curves were constructed with the polynomial function and linear regression. We proved that in our case the choice of the polynomial function was more appropriate since the quantity of related substances in low concentrations could not be properly determined by using linear regression. The optimized method was successfully verified on the finished pharmaceutical product. The results obtained with the HPLC and the optimized TLC method for the active pharmaceutical ingredient were statistically evaluated by T-test of pairs. Statistical evaluation proved that the methods were statistically comparable and that there was no important statistical difference between both methods in quantification of selected impurities either in active pharmaceutical ingredient or in pharmaceutical product.

KEYWORDS

Thin layer chromatography, quantitative evaluation, method optimization, polynomial function

SEZNAM OKRAJŠAV

- TLC – tankoplastna kromatografija
- t. i. – tako imenovani
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- HPTLC – tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti
- R_f – retardacijski faktor
- °C – stopinje Celzija
- µm – mikrometer
- Å – angstrom (10^{-10} m)
- nm – nanometer
- RP – reverzno-fazna kromatografija
- Ph. Eur. – Evropska farmakopeja
- µl – mikroliter
- ADC – avtomatska kadička za razvijanje
- mm – milimeter
- UV – ultravijolična svetloba
- UV₂₅₄ – ultravijolična svetloba valovne dolžine 254 nm
- UV₃₆₆ – ultravijolična svetloba valovne dolžine 366 nm
- GC – plinska kromatografija
- TLC-MS – tankoplastna kromatografija sklopljena z masnim detektorjem
- HPLC-MS – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti sklopljena z masnim detektorjem
- HPLC-UV – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti sklopljena z UV detektorjem
- ml – mililiter
- mg – miligram
- ZU – zdravilna učinkovina
- \bar{x} - povprečje razlik
- S_d – standardna deviacija
- n – število meritev
- R_t – retencijski čas
- R² – korelacijski koeficient
- AU – površina vrha

1 UVOD

Farmacevtska industrija je danes ena od najbolj inovativnih in dobičkonosnih industrijskih panog na svetu. Od farmacevtske industrije se pričakuje vedno večja kakovost zdravil, ki morajo biti hkrati tudi varna in učinkovita. Eden od pomembnih predpogojev za kakovostne končne izdelke je ustrezna kakovost vhodnih surovin. Omenjeni pogoji zahtevajo zelo natančne, občutljive, specifične in pogosto tudi kompleksne analizne metode, kot so tekočinska kromatografija, plinska kromatografija in druge. Uporaba teh dragih, vendar zelo učinkovitih metod, nam omogoča detekcijo in kvantifikacijo nečistot in sorodnih substanc v zelo nizkih koncentracijah. Tankoplastna kromatografija (TLC) je nedvomno manj selektivna in natančna metoda, vendar ima številne prednosti pred ostalimi analiznimi tehnikami (1, 2).

Prednosti TLC (1):

- vsestranskost;
- enostavnost;
- hitri rezultati;
- nizka cena;
- detekcija pri različnih virih svetlobe;
- rezultati so vidni (ocenimo jih lahko s prostim očesom).

Slabosti oziroma omejitve TLC (2):

- TLC je odprt sistem (kromatografska plošča je izpostavljena vplivom okolja, ki jih je težko nadzorovati);
- ni v celoti avtomatizirana metoda, zahtevane so ročne operacije (te so lahko vzrok napak in težav);
- ločevanje komponent preiskovane raztopine je navadno slabše kot pri HPLC metodi.

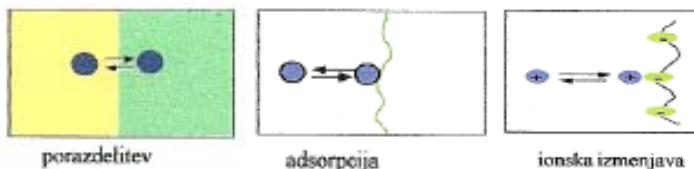
1.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

TLC je separacijska tehnika, ki temelji na različni afiniteti spojin do stacionarne in mobilne faze v kromatografskem sistemu. Stacionarna faza sestoji iz primernega materiala, ki je

enakomerno nanesen v tankem sloju na steklene, plastične ali druge primerno podlago. Mobilna faza je topilo ali mešanica topil, ki omogoča separacijo molekul oziroma spojin, ki so nanesene na stacionarni fazni (razvijanje) (2, 3).

Ločevanje lahko temelji na podlagi (slika 1) (4):

- adsorpcije;
- porazdelitve topljencev med dve topili, ki se med seboj ne mešata;
- ionske izmenjave;
- kombinacije vseh teh mehanizmov.



Slika 1: Shematični prikaz različnih tipov separacije (4)

1.2 ZGODOVINA RAZVOJA TLC

Začetki TLC segajo v leto 1938, ko so raziskovalci dosegli separacijo rastlinskega ekstrakta na tanki plasti adsorbenta. Izmailov in Schraiber (5) sta na univerzi v Harkovu (Ukrajina) iskala preprosto separacijsko tehniko, za katero je potrebno manj vzorca in adsorbenta. Kot stacionarna faza sta uporabila aluminijev oksid, nanesen na steklene podlago. Na plast adsorbenta sta nanesla vzorec (rastlinski ekstrakt) in topilo v obliki kapljice. Pojavili so se različno obarvani obroči. Novo tehniko sta poimenovala kapljična kromatografija (ang. »drop chromatography«). Leta 1949 sta Meinhard in Hall (6) uporabila škrob kot vezivo in s tem plasti adsorbenta povečala trdnost. S svojo metodo sta uspela ločiti anorganske ione. Tehniko sta poimenovala površinska kromatografija (ang. »surface chromatography«). Kirchner (6) je kasneje uporabil sedaj konvencionalno ascendentno metodo. Plast adsorbenta je temeljila na silicijevi kislini. S to metodo je dosegel separacijo terpenskih derivatov, tehniko pa je poimenoval kromatografija na trakovih (ang. »chromatostrips«). Reitsema (6) je to nadgradil in uporabil širšo ploščo ter tako dosegel hkratno separacijo več vzorcev v eni analizi. Kot vezivo je pri pripravi adsorbenta uporabljal kalcijev sulfat. Leta 1962 je Kurt Randerath objavil knjigo »Thin-Layer Chromatography«, kateri je v naslednjih letih sledilo še več knjig s področja

tankoplastne kromatografije (7). Stahl (7) s sodelavci je v svojem delu opisal pomen debeline plasti adsorbenta, enakomernost nanosa plasti adsorbenta, standardizacije parametrov adsorbentov, kot so velikost por in delcev ter specifične površine delcev. Vsi ti parametri so bili prepoznani kot kritični in so omogočali visoko ponovljivost metode in dobro ločbo. TLC je tako postala znana kot analizna tehnika, ki je bila izredno hitra in poceni in je imela široko področje uporabe (5, 6, 7, 8).

1.3 TEORETIČNE OSNOVE TLC

Glavni namen TLC je ločevanje posameznih komponent v zmesi. Kromatogram raztopine vzorca lahko okarakteriziramo po številu in poziciji lis na kromatografski plošči. Separacija s TLC je posledica razlik v interakcijah posameznih komponent vzorca s stacionarno in mobilno fazo. Ko mobilna faza potuje ascendentno po stacionarni fazi, so komponente vzorca podvržene dvema nasprotnočima se silama, tj. kapilarnemu efektu in sili interakcije posamezne komponente z delci stacionarne faze. Gonilna sila mobilne faze je kapilarni efekt, ki povzroči, da se komponente vzorca gibljejo v smeri toka mobilne faze. Sila upora, ki predstavlja interakcijo komponent vzorca z delci stacionarne faze, ovira to gibanje tako, da molekule ostanejo vezane na stacionarno fazo z adsorpcijo. Tako molekule neprestano prehajajo med stacionarno in mobilno fazo. Po končanem razvijanju kromatografske plošče v mobilni fazi vsaka komponenta iz vzorca prepotuje določeno pot. Komponenta, ki ima večjo afiniteto do stacionarne faze, bo prepotovala krajšo pot, komponente, ki pa so v mobilni fazi bolj topne oziroma izkazujejo slabše interakcije s stacionarno fazo, bodo prepotovale daljšo pot. Pot, ki jo molekule prepotujejo, izrazimo z retardacijskim faktorjem oziroma R_f vrednostjo, ki je razmerje med potjo, ki jo je prepotovala posamezna komponenta vzorca, in potjo mobilne faze, merjeno od linije nanašanja.

$$R_f \text{ vrednost} = \frac{\text{pot komponente vzorca (mm)}}{\text{pot mobilne faze (mm)}}$$

/1/

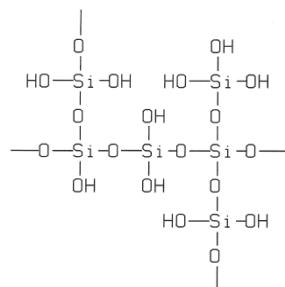
Na podlagi R_f vrednosti lahko identificiramo komponente vzorca s primerjavo R_f vrednosti znanih komponent oziroma standardov (9, 10).

1.4 STACIONARNA FAZA IN RAZLIČNE VRSTE ADSORBENTOV

Kot stacionarna faza se je v začetku razvoja TLC metode uporabljal aluminijev oksid. Danes je najpogosteje uporabljenia stacionarna faza silikagel, ki je že komercialno pripravljena. Poznamo tudi vrsto drugih stacionarnih faz, katerih značilnosti bomo opisali v nadaljevanju. Podrobno bomo predstavili le dve najbolj uporabni stacionarni fazi, tj. silikagel in celulozo (11).

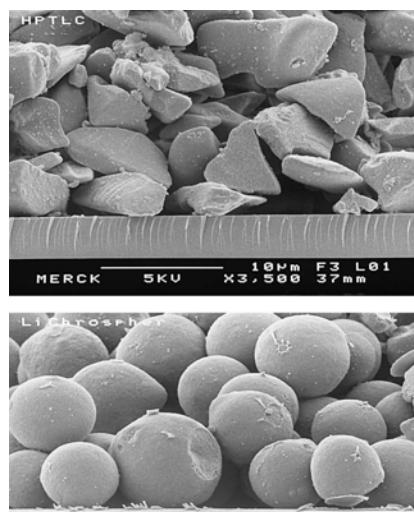
1.4.1 SILIKAGEL

S kemijskega vidika je silikagel (sinonim je tudi silicijeva kislina) bel, amorfen in porozen material, ki ga dobimo v obliki praška. Gre za hidratiran silicijev dioksid ($\text{SiO}_2 \times (\text{H}_2\text{O})_n$). Proses pridobivanja silikagela se prične tako, da silicijev dioksid pretvorimo v topen natrijev silikat v reakciji z natrijevim karbonatom ali natrijevim hidroksidom v vodni disperziji. Raztopino nato nakisamo, da hidrolizira v silicijeve kislino (H_4SiO_4), ki nato spontano polimerizira oziroma kondenzira v zelo majhne sferične delce (t. i. primarne delce). Ti koloidni delci rastejo s pomočjo agregacije in med njimi se vzpostavijo siloksanske vezi. V procesu rasti delcev se izloča voda, ki je produkt kemijske reakcije, in nastane gel. V tem procesu je zelo pomembna kontrola temperature in pH, saj narekujeta lastnosti nastajajočega hidrogela. Siloksanske vezi ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$) med silicijevimi atomi omogočajo trdnost hidrogela in nastane t. i. »pogača«. »Pogačo« nato zdrobijo in sperejo natrijeve soli ter druge topne nečistote. Gel sušijo pri približno 120°C . Tako nastane trdna porozna struktura, ki ji pravimo silikagel. V naslednji stopnji ga zmeljejo in sejejo, da dobijo delce želenih velikosti. Na površini delcev so poleg siloksanskih skupin prisotne tudi hidroksilne skupine (silanolne skupine), ki so v največji meri odgovorne za adsorpcijske lastnosti silikagela (slika 2). Sposobnost adsorpcije molekul na površino omogoča ločevanje spojin oziroma delcev v heterogenih vzorcih (11, 12, 13).



Slika 2: Struktura silikagela (13)

Velikost in porazdelitev velikosti delcev silikagela sta ključni lastnosti, ki narekujeta dobro ločevanje spojin. Velikost delcev na silikagelski TLC plošči je običajno v območju 5–40 µm, na HPTLC plošči pa so delci v območju velikosti delcev 5–7 µm, kar nam omogoča boljšo ločbo spojin na ploščah. Porazdelitev velikosti delcev silikagela in oblika delcev silikagela se razlikuje pri različnih tipih kromatografskih plošč kar prikazuje slika 3 (13).



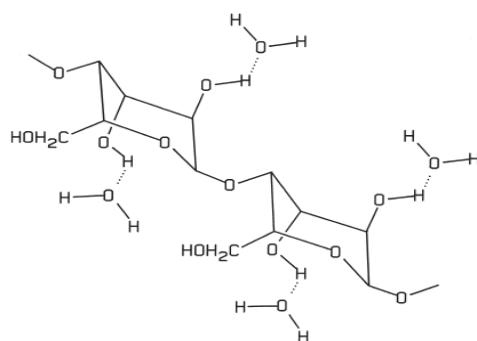
Slika 3: Fotografija, posneta z elektronskim mikroskopom (zgoraj HPTLC silikagel 60 F254; spodaj HPTLC LiCrospher® Si 60) (12)

Med proizvodnim procesom pridobivanja silikagela lahko vplivamo tudi na velikost por silikagela. S spremenjanjem velikosti por vplivamo na sposobnost ločevanja in hitrost potovanja spojin na kromatografski plošči med razvijanjem. V praksi se največkrat uporablja silikagel, ki ima velikost por 6 nm (kar ustreza 60 Å). Od tu poimenovanje »Si 60«. Glavna prednost silikagela kot stacionarne faze je v širokem območju uporabe, saj je primeren za ločevanje polarnih spojin. Njegova glavna slabost je, da se na površino silikagela lahko veže voda, ki vpliva na Rf vrednost. Da to v največji meri preprečimo, je potrebno zagotoviti konstantno zračno vlago tako v prostoru, kjer se izvaja nanašanje raztopin, kot v prostoru, kjer poteka razvijanje kromatografskih plošč (11, 13, 14, 15).

1.4.2 CELULOZA

Celuloza ima polimerno strukturo. Sestavljajo jo glukopiranozne enote, ki so med seboj povezane z 1,4- β -glikozidnimi vezmi. Prisotnih je veliko prostih hidroksilnih skupin, ki lahko tvorijo vodikove vezi (slika 4). Celuloza je popolna stacionarna faza za separacijo hidrofilnih substanc, kot so aminokisline, ogljikovi hidrati, anorganski ioni in derivati

nukleinskih kislin. Za pripravo stacionarne faze se pri TLC metodah uporabljata dva tipa celuloze. Prvi je v obliki naravnih vlaken s tipično polimerizacijsko stopnjo med 400 in 500 glukopiranoznih enot. Drugi tip je mikrokristalinična oblika (ali Avicel®) v obliki drobnega praška in je pripravljen z delno hidrolizo. Stopnja polimerizacije je pri tem tipu med 40 in 200 glukopiranoznih enot. Pri pripravi celuloznih plošč ni potrebno dodajati veziv, kot pri pripravi silikagelskih plošč. Za razliko od silikagelnih plošč je tu ločljivost med posameznimi lisami slabša in je za dobro ločbo potrebnega več časa. Ločevanje posameznih komponent vzorca je na celuloznih ploščah doseženo večinoma po načelu porazdelitve (16, 17, 18).



Slika 4: Shematski prikaz strukture celuloze, ki tvori vodikove vezi z vodo (16)

1.4.3 DRUGI TIPI ADSORBENTOV ZA PRIPRAVO STACIONARNE FAZE

V preglednici I je predstavljenih še nekaj tipov stacionarnih faz in najpogosteji tipi spojin, ki jih lahko identificiramo oziroma ločujemo (19).

Preglednica I: Tabela različnih tipov adsorbentov in njihove značilnosti

TIP ADSORBENTA	PRINCIP KROMATOGRAFSKE LOČBE	TIPIČNE APLIKACIJE
aluminijev oksid	adsorpcija (polarne interakcije)	alkaloidi, steroidi, terpeni, alifatske, aromatske in bazične spojine
poliamid	Porazdelitev (polarne interakcije, npr. vodikove vezi)	Fenolne in polifenolne naravne spojine
Silanizirani silikagel	Reverzno-fazna kromatografija	Polarne substance (bazične in kisle aktivne farmacevtske učinkovine)

TIP ADSORBENTA	PRINCIP KROMATOGRAFSKE LOČBE	TIPIČNE APLIKACIJE
RP-2, RP-8, RP-18	Reverzno-fazna kromatografija	Nepolarne substance (lipidi, aromatične spojine)
Silikagel, modificiran z amino skupinami	Ionska izmenjava, normalnofazna in reverzno-fazna kromatografija	Nukleotidi, vitamini, sulfonske kisline, karboksilne kisline, ksantini, fenoli, pesticidi

1.5 MOBILNA FAZA

Mobilna faza je v kromatografskem sistemu topilo oziroma mešanica topil, s katero lahko vplivamo na končni rezultat ali ga celo izboljšamo (to je separacija posameznih komponent v vzorcu). Mobilna faza je v kromatografskem sistemu nosilec transportnega procesa in mora omogočati:

- da so komponente vzorca v njej topne;
- transport vzorcev na plasti adsorbenta;
- ustrezno selektivnost do komponent vzorca, ki jih ločujemo.

Topila, ki jih uporabljamo za pripravo mobilne faze, morajo ustrezati kriterijem, kot so:

- ustrezna čistost in stabilnost topil;
- nizka viskoznost;
- nizka stopnja toksičnosti topil;
- parni tlak topil ne sme biti prenizek in tudi ne previsok (če je parni tlak določenega topila zelo visok, to pomeni, da bo topilo bolj izhlapevalo, kar lahko posledično vpliva na sestavo mobilne faze).

Sestava mobilne faze lahko vpliva na položaj komponent vzorca oziroma na Rf vrednosti in je odgovorna tudi za selektivnost ločbe (20, 21).

1.5.1 ELUCIJSKA MOČ TOPILA

Izraz elucijska moč topila opisuje vpliv mobilne faze na zadrževanje vzorca in ustreza adsorpcijski energiji izbranega sorbenta za izbrano topilo. Večja kot je elucijska moč topila, manjše je zadrževanje vzorca in večja je R_f vrednost. Glede na to, kakšen je mehanizem zadrževanja, ima elucijska moč topila različne vplive. Pri separaciji molekul na podlagi adsorpcije pomeni elucijska moč topila polarnost topila. Polarnejša topila lažje interagirajo s polarnimi funkcionalnimi skupinami sorbentov. Pri reverzno-fazni kromatografiji je elucijska moč topila izražena kot lipofilnost, pri ionsko izmenjevalni kromatografiji je elucijska moč topila odvisna od pH. Isto topilo ima lahko različno elucijsko moč topila na različnih stacionarnih fazah (21, 22, 23).

1.5.2 SELEKTIVNOST

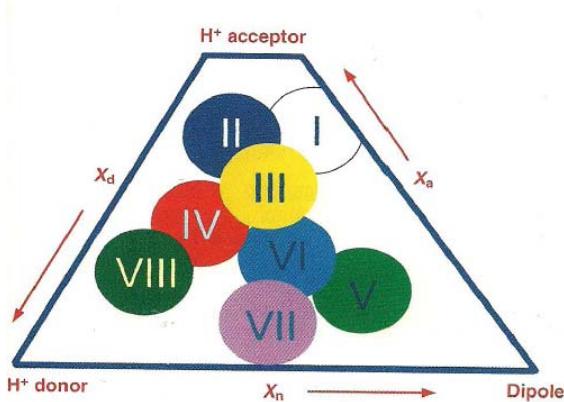
Zelo pomemben dejavnik je tudi selektivnost topila. Selektivnost je lastnost topila, da selektivno razaplja le eno od snovi, četudi se po polarnosti ne razlikuje od drugih topil. Sestava mobilne faze se lahko načrtuje in izračuna na podlagi različnih matematičnih modelov. Selektivnost topila lahko razložimo na več načinov. Eden izmed najpogosteje uporabljenih modelov, ki kvantitativno opisuje selektivnost topil, je model, ki ga je razvil Snyder (24). Uporabil je tri testna topila, in sicer etanol, dioksan in nitrometan, s katerimi je raziskal tri parametre selektivnosti, ki so:

- X_a , kjer je določal sprejemanje protonov;
- X_d , kjer je določal oddajanje protonov;
- X_n , kjer je določal dipolne interakcije.

Seštevek vseh treh parametrov selektivnosti je vedno 1. Podatke, ki jih je Snyder (24) dobil za različna topila, je razvrstil v osem skupin, kar prikazuje slika 5 (21, 24, 25).

- I. skupina: alifatski etri;
- II. skupina: alifatski alkoholi;
- III. skupina: tetrahidrofuran, derivati piridina, glikolni etri;
- IV. skupina: glikoli, ocetna kislina, fenol, formamid;
- V. skupina: diklorometan, etilenklorid;
- VI. skupina: alifatski ketoni in estri, nitrili;

- VII. skupina: aromatski ogljikovodiki;
- VIII. skupina: kloroform, voda.



Slika 5: Snyder-jev diagram – shematski prikaz uvrstitve skupin topil glede na osnovne tri parametre selektivnosti (24)

1.6 NANAŠANJE VZORCEV NA STACIONARNO FAZO

Dobra ločba spojin je v veliki meri odvisna od nanašanja vzorca (raztopine). Pri nanašanju raztopin moramo biti pozorni na napake, ki lahko vplivajo na končni rezultat, kot so (3, 26, 27):

- vse raztopine na kromatografski plošči morajo biti nanesene v isti liniji, da se za vse hkrati začne separacija;
- pozorni moramo biti na odmik nanesenih raztopin od stranskega in spodnjega roba plošče;
- pomemben je razmik med posameznimi nanosi, da ne pride do mešanja nanesenih raztopin (Evropska farmakopeja (27) predpisuje pri nanašanju v točko razmik med posameznimi nanosi vsaj 10 mm na TLC plošči in vsaj 5 mm na HPTLC plošči, merjeno od sredine nanosa, ter pri nanašanju v črtico vsaj 5 mm na TLC plošči in vsaj 2 mm na HPTLC plošči, merjeno od konca zadnjega nanosa do začetka naslednjega nanosa);
- raztopine je potrebno nanašati v več manjših volumnih, da je premer nanosa v točko čim manjši in dolžina nanosa v črtico kot jo predpisuje analizna metoda;
- volumen nanesenih raztopin mora biti kontroliran, kar je pomembno pri kvalitativnem in kvantitativnem vrednotenju. Pri ugotavljanju istovetnosti (kvalitativno vrednotenje) nam Ph. Eur. (27) predpisuje, da lahko istovetnost

potrdimo, če lise na kromatogramu preiskovane raztopine ustrezano lisam na kromatogramu referenčne substance po R_f vrednosti, velikosti in obliki. Pri ugotavljanju vsebnosti sorodnih substanc ali nečistot (kvantitativno vrednotenje) lahko napačen volumen nanašanja pomeni napačno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc ali nečistot;

- pri nanašanju raztopin moramo paziti, da se stacionarna faza pri tem ne poškoduje.

1.6.1 NANAŠANJE RAZTOPIN V TOČKO

Nanašanje v točko je najpreprostejši in najpogosteje uporabljeni način nanašanja raztopin. Prednost nanašanja v točko je v njegovi preprostosti. Raztopine se na stacionarno fazo nanašajo s steklenimi mikropipetami ali mikrokapilarami. Uporabimo lahko tudi nanašalnik z nanašalno iglo, kjer lahko kontroliramo hitrost nanašanja. Po nanašanju je potrebno posamezne nanose posušiti v toku hladnega zraka. Pri zelo hlapnih komponentah vzorca se lahko zgodi, da izhlapijo, če jih sušimo v toku hladnega zraka. V tem primeru nanose sušimo na zraku. Za sušenje občutljivih vzorcev lahko uporabljam tudi dušik, ki je kemijsko inerten (26, 28).

1.6.2 NANAŠANJE RAZTOPIN V ČRTICO

Z nanašanjem v črtico navadno dosežemo boljše ločevanje komponent vzorca in ponovljivost rezultatov. V ta namen se uporablja polavtomatski ali avtomatski nanašalniki (slika 6), ki omogočajo nanašanje z razprševanjem. Z njimi dosežemo, da je nanos zelo tanek, kar je ključnega pomena za uspešno ločbo. Topilo, v katerem so pripravljene raztopine, že med samim nanašanjem odpareva s pomočjo toka zraka ali inertnega plina. Vzorci se tako med nanašanjem koncentrirajo. Z nanašalniki lahko nanašamo relativno velike volumne raztopin (tudi več kot 100 µl) ter tudi zelo viskozne raztopine. Izognemo se različnim dolžinam nanesenih raztopin v črtico, kar je pri ročnem nanašanju težje dosegljivo. Omogoča, da je koncentracija analita enakomerno porazdeljena po celotni dolžini nanosa (26, 28).



Slika 6: Primer polavtomatskega (levo) in avtomatskega (desno) nanašalnika proizvajalca Camag (29)

1.7 RAZVIJANJE

Razvijanje poteka v za to namenjenih kromatografskih kadičkah, ki nam omogočajo ponovljivo in konstantno atmosfero. Danes je na trgu kar nekaj različnih tipov in dimenzij kromatografskih kadičk (30):

- kadičke za razvijanje z ravnim dnom;
- dvoprekatne kadičke za razvijanje;
- kadičke za horizontalno razvijanje.

Kadičke so lahko nasičene s parami mobilne faze, lahko so nenasičene ali pa le delno nasičene. Pri nasičenih kadičkah so stene kadičke obložene s filter papirjem, ki je omočen z mobilno fazo. Kadičko pustimo, da se nasiti s parami mobilne faze, dokler ni doseženo razmerje med tekočo in parno fazo (pogoji ločevanja spojin so kontrolirani in posledično so R_f vrednosti konstantne). Pri nenasičenih kadičkah stene niso obložene s filter papirjem, mobilno fazo pa vlijemo v kadičko tik pred razvijanjem. V tem primeru plinska faza stalno odpareva s površine plasti adsorbenta (mobilna faza potuje počasneje, R_f vrednosti so navadno višje kot pri nasičenih kadičkah). Delno nasičene kadičke ravno tako niso obložene s filter papirjem. Mobilno fazo vlijemo v kadičko in pustimo, da se ustvarijo hlapi mobilne faze (slabša ponovljivost rezultatov). Z namenom, da bi se pri razvijanju lahko izognili zunanjim vplivom, je proizvajalec Camag razvil avtomatsko kadičko za razvijanje (slika 7). Prednost te kadičke je, da lahko kontroliramo relativno zračno vлагo in temperaturo, pri kateri poteka razvijanje kromatografske plošče. Parametre postopka razvijanja lahko nastavljamo preko računalniškega programa (3, 30, 31, 32).



Slika 7: Avtomatska kadička za razvijanje (ADC2) proizvajalca Camag (33)

1.8 KVANTITATIVNO IN KVALITATIVNO VREDNOTENJE KROMATOGRAMOV

Za planarne kromatografske tehnike je značilno, da ločene komponente zmesi ostajajo na plasti adsorbenta (stacionarne faze). To nam omogoča enostavno vrednotenje ločenih komponent. Za vizualno vrednotenje uporabljamo video dokumentacijske sisteme. V preteklosti je bila ponovljivost TLC metod mnogo slabša kot ponovljivost HPLC metod. Z avtomatizacijo TLC sistemov (nanašalniki, avtomatske razvijjalne komore ...) se je ponovljivost TLC metod znatno izboljšala in je danes pogosto primerljiva s HPLC metodami (34, 35).

1.8.1 UV SVETLOBA

Pri vrednotenju kromatogramov uporabljamo dve vrsti UV svetlobe glede na njeno valovno dolžino:

- UV svetloba kratke valovne dolžine (254 nm);
- UV svetloba dolge valovne dolžine (366 nm).

Za to vrsto detekcije uporabljamo vire UV svetlobe (žarnice), ki omogočajo vzbujanje pri tej valovni dolžini. Uporabljajo se komercialno pripravljene plošče, ki imajo na površini vezan fluorescenčni indikator. Le-ta nam omogoča, da opazimo lise, kot črne lise na zeleni ali svetlo modri podlagi. Pri detekciji z UV_{366} nm je ozadje črne barve. Spojine, ki absorbirajo svetlobo pri tej valovni dolžini, vzbudimo, da oddajajo fluorescenco ali fosforescenco in so zato videti kot svetle lise na temni podlagi (1, 36).

1.8.2 VIDNA SVETLOBA

Detekcija z vidno svetlogo je najpreprostejši način vizualizacije. Identificiramo lahko le substance, ki so že same po sebi obarvane. Drugi način detekcije z vidno svetlogo pa je uporaba orositvenih reagentov. Ti so specifični za določene komponente vzorca. Po oroševanju poteče reakcija, ki jo lahko sprožimo tudi s segrevanjem stacionarne faze pri določeni temperaturi. Tako lahko identificiramo specifične komponente vzorcev (36).

1.8.3 KVANTITATIVNO VREDNOTENJE KROMATOGRAMOV

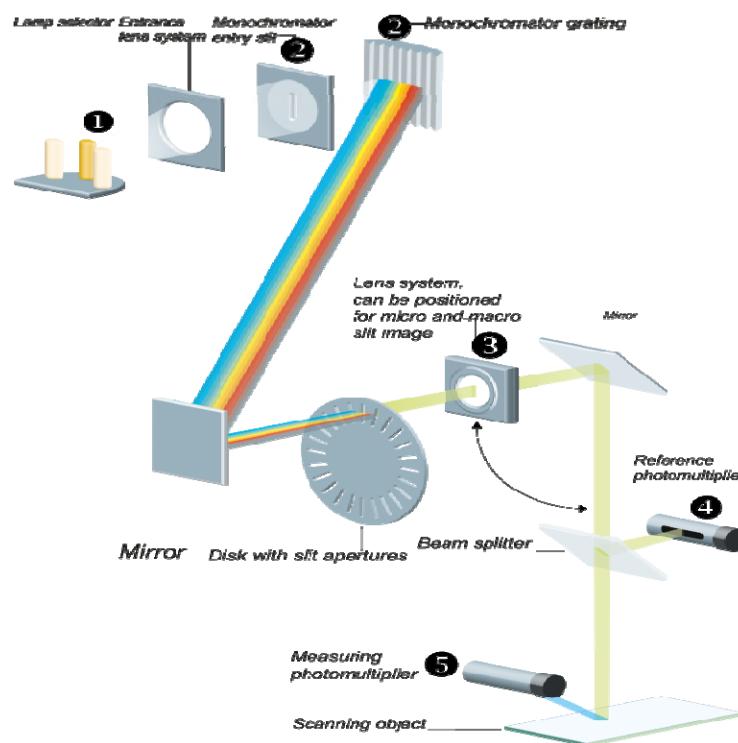
Z razvojem kvantitativnega vrednotenja je TLC postala sprejeta kot zanesljiva metoda izbora, ki se je lahko primerjala z drugimi kromatografskimi metodami, npr. HPLC in GC. Substance, ki jih ločimo s TLC metodo, lahko neposredno vrednotimo na kromatografski plošči. Za kvantitativno vrednotenje uporabljamo t.i. denzitometer (slika 8). Denzitometrija pomeni merjenje intenzitete (optične gostote) lis na stacionarni fazi. Kot vir svetlobe v denzitometru lahko izbiramo med tremi možnostmi. Na voljo imamo volframovo žarnico (350–900 nm), devterijevo žarnico (190–450 nm) ter živosrebrno žarnico (254–578 nm). Optični sistem v denzitometru nam omogoča, da imamo ozek žarek svetlobe specifične valovne dolžine, ki pade na kromatografsko ploščo. Nekaj svetlobe se na lisah absorbira, preostanek svetlobe pa se odbije in pade na fotopomnoževalko. Merimo lahko tudi transmisijo svetlobe. Celotno operacijo nadzorujemo in upravljamo s pomočjo programske opreme, ki nam omogoča, da lahko posamezne vrhe (pike) integriramo in kvantitativno ovrednotimo. Glavni viri napak v denzitometriji so predvsem ponovljivost nanašanja raztopin na kromatografsko ploščo, zunanji pogoji pri razvijanju kromatografske plošče, določitev sredine nanosa na kromatografski plošči ter samo merjenje. Velik vpliv na ponovljivost ima tudi širina in dolžina reže, ki jo nastavimo v denzitometru. Dokazano je, da ima večji vpliv na ponovljivost dolžina reže kot pa širina reže (3, 37, 38).



Slika 8: Denzitometer proizvajalca Camag (39)

Princip delovanja denzitometra (slika 9) (40):

- izberemo vir svetlobe na podlagi valovne dolžine, pri kateri bomo snemali kromatografsko ploščo (1);
- žarek izbrane valovne dolžine gre skozi lečo, ki fokusira žarek svetlobe na vstopno režo monokromatorja (2) in na uklonsko mrežo monokromatorja (2);
- svetloba se ukloni na ravni zrcala od koder se odbije in gre skozi režo izbranih dimenzij (3) na naslednjo ravni zrcala;
- od zrcala se svetloba odbije na naslednje zrcalo, kjer se žarek svetlobe razdeli na dva dela (del svetlobe gre na referenčno fotopomnoževalko (4), del svetlobe pa gre na kromatografsko ploščo);
- svetlobo, ki se odbije od kromatografske plošče, izmeri druga fotopomnoževalka (5), ki je nameščena pod kotom 30° glede na kromatografsko ploščo;
- pod kromatografsko ploščo se nahaja še ena fotopomnoževalka, ki izmeri prepuščeno svetlobo (če merimo transmitanco).



Slika 9: Optični sistem v denzitometru (39)

1.9 SORODNE SUBSTANCE

Farmacevtski terminološki slovar opisuje, da je sorodna substanca nečistota v zdravilu, ki je po kemični strukturi podobna zdravilni učinkovini (41). Ločimo naslednje vrste sorodnih substanc (42):

- znane ali neznane sorodne substance, ki lahko nastanejo med sintezo zdravilne učinkovine ali intermediatov in se njihova vsebnost tekom shranjevanja končnega izdelka ne spreminja;
- znane ali neznane sorodne substance, ki so posledica kemijskega razpada zdravilne učinkovine, ali pa so posledica proizvodnega procesa in njihova vsebnost tekom shranjevanja končnega izdelka običajno narašča (včasih lahko tudi upada, če se posamezna komponenta pretvarja še naprej).

Sorodne substance, ki so prisotne v končnem izdelku, lahko vplivajo na kakovost, varnost in učinkovitost izdelka. Že tekom razvoja zdravilne učinkovine in končnega izdelka, je potrebno ugotoviti morebitne znane in neznane sorodne substance ter razviti analizne metode za njihovo vrednotenje. Z analiznimi metodami, kjer vrednotimo sorodne substance, zaznamo organske nečistote, ki se pojavljajo v zdravilni učinkovini ali farmacevtskem izdelku. Analizne metode morajo biti sposobne zaznati tudi najmanjše koncentracije sorodnih substanc, zato je potrebno, da so v specifikaciji predpisane analizne metode, ki so dovolj občutljive. Hkrati morajo biti analizne metode natančne in nam morajo dati ponovljive rezultate.

2 NAMEN DELA

V fazi kontrole kakovosti surovin, polizdelkov in končnih izdelkov je ključnega pomena razvoj robustne in natančne analizne metode, ki nam dajejo točne in ponovljive rezultate. Namen našega eksperimentalnega dela je optimizacija analizne metode za kvantitativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc v izbrani zdravilni učinkovini s tankoplastno kromatografijo. Trenutno uporabljena TLC metoda za ugotavljanje sorodnih substanc v omenjeni zdravilni učinkovini nam omogoča semi-kvantitativno vrednotenje sorodnih substanc. Monografija v Ph. Eur. vsebuje za kvantitativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc le HPLC metodo. Z našim delom želimo razviti TLC metodo, ki bo po sposobnosti kvantitativnega vrednotenja posameznih sorodnih substanc primerljiva z oficinalno HPLC metodo, bo pa hitrejša, enostavnejša in zato stroškovno primernejša za industrijsko kontrolo kakovosti. V okviru magistrske naloge bomo metodo preizkusili tudi na končnem farmacevtskem izdelku, ki vsebuje isto zdravilno učinkovino. Izmed vseh sorodnih substanc, ki jih bomo vrednotili, si bomo izbrali dve ter njuno vsebnost statistično primerjali z rezultati vrednotenja njune vsebnosti z validirano farmakopejsko HPLC metodo. Da bomo zagotovili, da so v vrednotenje vključene dejansko iste sorodne substance, bomo vzorec analizirali tudi s pomočjo LC-MS in TLC-MS. Na ta način bomo potrdili, da z obema metodama vrednotimo iste sorodne substance in s tem bomo potrdili verodostojnost naših rezultatov.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

3.1.1 UPORABLJENI MATERIALI

- HPTLC plošče: serijska številka HX259809, Merck, Nemčija
- Igla za nanašanje vzorcev: Hamilton, Camag, Švica
- Filter papir: Macherey-Nagel, MN617, Nemčija
- Sušilnik: Kambič, SP-45, tovarniška številka 06072515, Slovenija
- Dvoprekatne kadičke 20 x 10 cm: Camag, Švica
- Aluminijasti pokrov za kadičke: Camag, Švica

3.1.2 STEKLOVINA

- Merilne bučke 10,0 ml, Fortuna, Singapur
- Merilne bučke 20,0 ml, Fortuna, Singapur
- Polnilne pipete: 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, Fortuna, Singapur
- Merilne pipete: 2 ml, 1 ml, Fortuna, Singapur
- Merilni valj 100 ml, Brand, Nemčija
- Čaša 50 ml, Brand, Nemčija

3.1.3 TOPILA IN REAGENTI

- Kloroform: Baker analyzed, J. T. Baker, ZDA
- Aceton: p.a., Merck, Nemčija
- Mravljična kislina: p.a., Merck, Nemčija
- Etanol, absolutni: puriss p.a., Sigma-Aldrich, ZDA
- 2 M raztopina amoniaka: 15,0 ml koncentriranega NH₃/100,0 ml vode
- Prečiščena voda
- Topilo za TLC: etanol, absolutni : 2 M raztopina amoniaka = 4 : 1 (V/V)

3.2 MOBILNA FAZA

- Mobilna faza za TLC

Kloroform : aceton : mravljična kislina = 60 : 30 : 5 (V/V/V)

3.3 METODE DELA

3.3.1 UPORABLJENI INSTRUMENTI

- Tehnica: XP205DR, Mettler Toledo, Švica
- Ultrazvočna kopel: Elmasonic S100, Elma
- Nanašalna naprava: Linomat 5, Camag, Švica
- Denzitometer: Scanner 4, Camag, Švica
- Video dokumentacijski sistem: TLC Visualizer, Camag, Švica
- UV kabinet: Camag, Švica
- TLC-MS vmesnik: serijska številka 171117, Camag, Švica

3.3.2 PRIPRAVA STANDARDOV ZA TLC

- Za zdravilno učinkovino:

➤ Osnovna raztopina standarda RS

V 10,0 ml merilno bučko smo natehtali 101,51 mg standarda zdravilne učinkovine. Dodali smo 5,0 ml topila in raztopino standarda obdelovali na ultrazvočni kopeli, dokler se standard zdravilne učinkovine ni popolnoma raztopil. Nato smo raztopino z istim topilom dopolnili do oznake volumna 10,0 ml. Tako pripravljeno raztopino smo nato nadalje redčili.

➤ Raztopina standarda RS1

V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,0 ml osnovne raztopine standarda RS in s topilom dopolnili do oznake volumna.

➤ Raztopina standarda RS2

V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,4 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.

➤ Raztopina standarda RS3

V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,2 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.

➤ Raztopina standarda RS4

V 20,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 2,0 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.

- Raztopina standarda RS5
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 0,8 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
 - Raztopina standarda RS6
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 0,6 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
 - Raztopina standarda RS7
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 5,0 ml raztopine standarda RS4 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
 - Raztopina standarda RS8
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 4,0 ml raztopine standarda RS4 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
 - Raztopina standarda RS9
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 3,0 ml raztopine standarda RS4 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
 - Raztopina standarda RS10
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 2,0 ml raztopine standarda RS4 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
 - Raztopina standarda RS11
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,0 ml raztopine standarda RS4 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Za farmacevtski izdelek:
 - Osnovna raztopina standarda RS
V 10,0 ml merilno bučko smo natehtali 100,0 mg standarda zdravilne učinkovine. Dodali smo 5,0 ml topila in raztopino standarda obdelovali na ultrazvočni kopeli, dokler se standard zdravilne učinkovine ni popolnoma raztopil. Nato smo raztopino z istim topilom dopolnili do oznake volumna 10,0 ml. Tako pripravljeno raztopino smo nato nadalje redčili.
 - Raztopina standarda RS1
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,0 ml osnovne raztopine standarda RS in s topilom dopolnili do oznake volumna.

- Raztopina standarda RS2
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 2,0 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS3
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,5 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS4
V 20,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 2,0 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS5
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 0,8 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS6
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 0,6 ml raztopine standarda RS1 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS7
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 5,0 ml raztopine standarda RS3 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS8
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 3,0 ml raztopine standarda RS3 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS9
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 2,0 ml raztopine standarda RS3 in s topilom dopolnili do oznake volumna.
- Raztopina standarda RS10
V 10,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 1,0 ml raztopine standarda RS3 in s topilom dopolnili do oznake volumna.

3.3.3 PRIPRAVA VZORCEV ZA TLC

- Za zdravilno učinkovino:

V 10,0 ml merilno bučko smo natehtali točno 100 mg vzorca zdravilne učinkovine (natehte so v preglednici II) in dodali 5,0 ml topila. Raztopino vzorca zdravilne učinkovine smo obdelovali na ultrazvočni kopeli, da se je vzorec popolnoma

raztopil. Nato smo z istim topilom vzorec dopolnili do oznake volumna 10,0 ml. Tako pripravljeno raztopino vzorca smo nanašali na stacionarno fazo.

Preglednica II: Natehte za pripravo vzorcev zdravilne učinkovine

SERIJA	NATEHTA	SERIJA	NATEHTA
KRKA1	100,45 mg	KRKA8	101,21 mg
KRKA2	100,37 mg	KRKA9	101,16 mg
KRKA3	100,82 mg	KRKA10	100,80 mg
KRKA4	100,02 mg	KRKA11	100,09 mg
KRKA5	100,09 mg	KRKA12	101,51 mg
KRKA6	101,30 mg	KRKA13	100,99 mg
KRKA7	100,08 mg	KRKA14	100,77 mg

- Za farmacevtski izdelek:

V 10,0 ml merilno bučko smo natehtali točno 140 mg vzorca farmacevtskega izdelka, kar ustreza 100 mg zdravilne učinkovine v farmacevtskem izdelku (točne natehte so v preglednici III) in dodali 5,0 ml topila. Raztopino vzorca farmacevtskega izdelka smo obdelovali na ultrazvočni kopeli, da se je vzorec popolnoma raztopil. Nato smo z istim topilom vzorec dopolnili do oznake volumna 10,0 ml. Vzorec smo nato še prefiltrirali preko filter papirja »črni trak« in tako pripravljeno raztopino vzorca nanašali na stacionarno fazo.

➤ Preračun za potrebno natehto vzorca:

Povprečna masa 1 tablete: 695 mg

Vsebnost zdravilne učinkovine v eni tableti je 500 mg, mi pa želimo natehtati količino vzorca, ki bo vsebovala 100 mg zdravilne učinkovine.

$$m(\text{vzorca}) = \frac{\text{masa 1 tbl} \times 100 \text{ mg}}{\text{vsebnost ZU v 1 tbl}} = \frac{695 \text{ mg} \times 100 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} = 139 \text{ mg}$$

/2/

Preglednica III: Natehte za pripravo vzorcev farmacevtskega izdelka

SERIJA	NATEHTA	SERIJA	NATEHTA
KRKA TBL 1	140,3 mg	KRKA TBL 4	139,3 mg
KRKA TBL 2	139,6 mg	KRKA TBL 5	139,6 mg
KRKA TBL 3	139,1 mg	KRKA TBL 6	139,4 mg

3.3.4 NANAŠANJE RAZTOPIN NA STACIONARNO FAZO

- Za zdravilno učinkovino:

Pripravljene raztopine smo nanesli na HPTLC silikagelsko 60 F₂₅₄ ploščo, s pomočjo nanašalne naprave Linomat 5, proizvajalca Camag iz Švice. Program, ki smo ga uporabili za nanašanje, je bil program proizvajalca, in sicer winCATS (verzija 1.4.6.). Za nanašanje smo uporabili 100 µl iglo za nanašanje. Na stacionarno fazo smo nanesli 11 nanosov v obliki črtice, dolžine 8 mm. Nanašali smo 10 mm od spodnjega roba stacionarne faze ter 26 mm od stranskega roba stacionarne faze. Med posameznimi nanosi je bilo 6 mm razmika. Natančni vrstni red nanašanja je opisan v preglednici IV.

Preglednica IV: Shema nanašanja za zdravilno učinkovino

Raztopina	RV	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	RS9	RS10	RS11
Volumen nanašanja	5µl										
Masni delež ZU	100 %	1,4 %	1,2 %	1,0 %	0,8 %	0,6 %	0,5 %	0,4 %	0,3 %	0,2 %	0,1 %

- Za farmacevtski izdelek:

Pripravljene raztopine smo nanesli na HPTLC silikagelsko 60 F₂₅₄ ploščo s pomočjo nanašalne naprave Linomat 5, proizvajalca Camag iz Švice. Program, ki smo ga uporabili za nanašanje, je bil program proizvajalca, in sicer winCATS (verzija 1.4.6.). Za nanašanje smo uporabili 100 µl iglo za nanašanje. Na stacionarno fazo smo nanesli 11 nanosov v obliki črtice, dolžine 8 mm. Nanašali

smo 10 mm od spodnjega roba stacionarne faze ter 26 mm od stranskega roba stacionarne faze. Med posameznimi nanosi je bilo 6 mm razmika. Na vsako stacionarno fazo smo nanesli dve različni seriji končnega farmacevtskega izdelka. Tako smo imeli za dve seriji končnega farmacevtskega izdelka eno umeritveno premico. Natančni vrstni red nanašanja je opisan v preglednici V.

Preglednica V: Shema nanašanja za farmacevtski izdelek

Raztopina	RS2	RS3	RS4	RS5	RV	RV	RS6	RS7	RS8	RS9	RS10
Volumen nanašanja	5µl										
Masni delež ZU	2,0 %	1,5 %	1,0 %	0,8 %	100 %	100 %	0,6 %	0,5 %	0,3 %	0,2 %	0,1 %

3.3.5 RAZVIJANJE STACIONARNE FAZE V MOBILNI FAZI

Za razvijanje stacionarne faze smo uporabili stekleno dvoprekatno kadičko, dimenziije 20 x 10 cm, proizvajalca Camag. Kadičko smo z obeh strani obložili s filter papirjem, ki smo ga predhodno omočili z mobilno fazo, in kromatografsko kad pustili pokrito 60 minut. V tem času se je kadička nasitila s parami mobilne faze. V nasičeno kadičko smo postavili naneseno ploščo in jo razvijali 80 mm, merjeno od linije nanašanja. Po končanem razvijanju smo ploščo posušili v sušilniku, pri 30 °C za 20 minut, da je izginil vonj po mobilni fazi. Postopek smo ponovili za vsako naneseno ploščo posebej (14 plošč, na katerih je bila nanesena ena serija zdravilne učinkovine in 3 plošče, na katerih sta bili naneseni dve seriji končnega farmacevtskega izdelka).

3.3.6 KVANTITATIVNO VREDNOTENJE KROMATOGRAMOV (DENZITOMETRIJA)

Pri kvantitativnem vrednotenju zdravilne učinkovine smo imeli 14 plošč, pri vrednotenju končnega farmacevtskega izdelka pa smo imeli 3 plošče. Na vsako izmed plošč smo morali nanesti tudi raztopine standarda zdravilne učinkovine (shema nanašanja je opisana v preglednici IV za zdravilno učinkovino in v preglednici V za končni farmacevtski izdelek). To pomeni, da imamo za vsako serijo vzorca zdravilne učinkovine in za dve seriji končnega farmacevtskega izdelka svojo umeritveno krivuljo, na podlagi katere smo

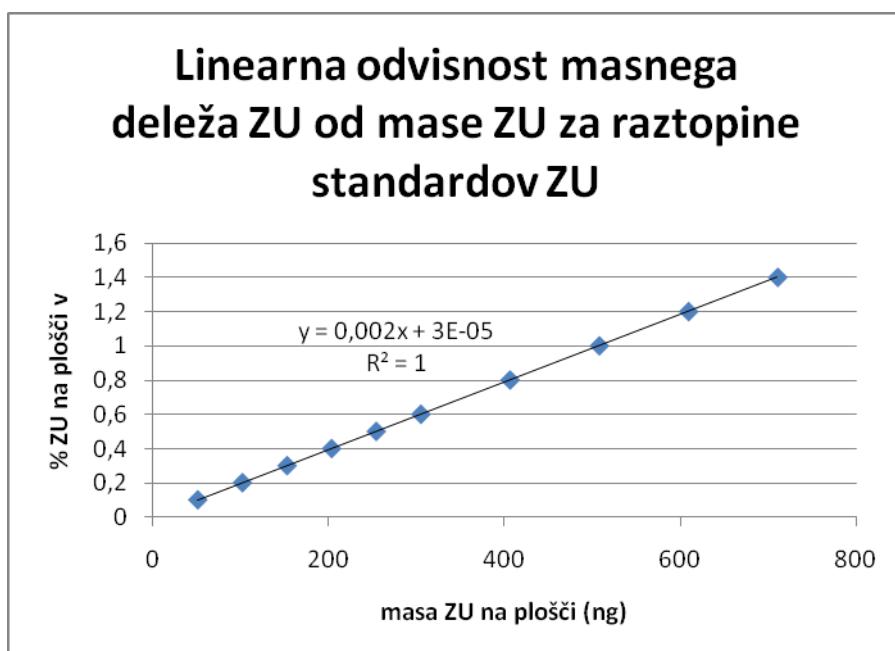
izračunali vsebnost sorodnih substanc. Suho ploščo smo kvantitativno ovrednotili na denzitometru Scanner 4, proizvajalca Camag iz Švice. Program, ki smo ga uporabili za kvantitativno vrednotenje, je bil program proizvajalca, in sicer winCATS (verzija 1.4.6.). Denzitograme smo posneli pri eni valovni dolžini (254 nm), pri tem pa smo kot vir svetlobe uporabili devterijevo žarnico. Denzitograme smo posneli s hitrostjo 20 mm/sekundo, režo smo nastavili na velikost 4,00 x 0,3 mm. Merili smo absorpcijo. Pri vsakem nanosu raztopine standarda zdravilne učinkovine je v nanesenem volumnu (5 µl) na kromatografski plošči, nanesena določena masa zdravilne učinkovine. Ker smo imeli na stacionarni plošči široko območje koncentracij standardov, smo za izračun enačbe premice uporabili polinomno funkcijo. Kot rezultat kvantitativnega vrednotenja dobimo za vsako sorodno substanco določeno površino vrha, ki jo vrednotimo na zdravilno učinkovino in ne na standard sorodne substance. Takšno vrednotenje smo uporabili zaradi nedostopnosti sorodnih substanc kot standard. Program winCATS nam na podlagi površine vrha sorodne substance in umeritvene krivulje poda maso sorodne substance v zdravilni učinkovini oziroma v farmacevtskem izdelku. Nato smo v programu Microsoft Office Excel izrisali diagram linearne odvisnosti masnega deleža zdravilne učinkovine od mase sorodne substance za vse koncentracije raztopin standardov. Gre za relativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc v vzorcu na zdravilno učinkovino. Tako smo lahko izračunali koliko % sorodne substance se v izbrani zdravilni učinkovini ali končnem farmacevtskem izdelku nahaja. Korelacijski koeficient (r) je 1, ker gre za teoretično pridobljene podatke iz ng v %.

- Za zdravilno učinkovino:

Za vse serije zdravilne učinkovine (14 serij) smo za nanašanje uporabili iste raztopine standardov. Iz tega sledi, da imamo na vseh kromatografskih ploščah, kjer je nanesena zdravilna učinkovina, iste koncentracije raztopin standardov in posledično iste mase zdravilne učinkovine v raztopini standardov. Slika 10 nam prikazuje umeritveno krivuljo linearne odvisnosti masnega deleža zdravilne učinkovine od mase zdravilne učinkovine (v 5µl) v raztopini standarda zdravilne učinkovine, in smo jo uporabili za izračun vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini.

Preglednica VI: Masa zdravilne učinkovine, ki ustreza koncentraciji raztopine standardov zdravilne učinkovine

Koncentracija zdravilne učinkovine (mg/ml)	m (ng)	Masni delež ZU v raztopini standarda (%)
0,142114	710,57	1,4
0,121812	609,06	1,2
0,101510	507,55	1,0
0,081208	406,04	0,8
0,060906	304,53	0,6
0,050755	253,75	0,5
0,040604	203,00	0,4
0,030453	152,25	0,3
0,020302	101,50	0,2
0,010151	50,75	0,1



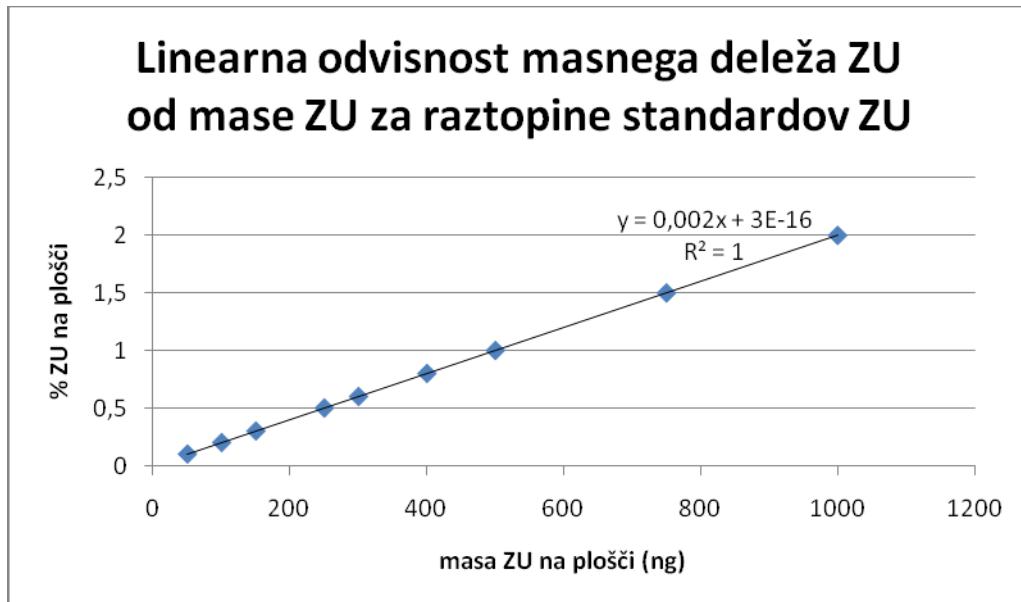
Slika 10: Diagram linearne odvisnosti masnega deleža zdravilne učinkovine od mase zdravilne učinkovine za vse koncentracije raztopin standardov zdravilne učinkovine

- Za farmacevtski izdelek:

Za vse serije končnega farmacevtskega izdelka (6 serij) smo za nanašanje uporabili iste raztopine standardov. Iz tega sledi, da imamo na vseh kromatografskih ploščah, kjer so nanesene serije končnega farmacevtskega izdelka, iste koncentracije raztopin standardov in posledično iste mase zdravilne učinkovine v raztopini standardov. Slika 11 nam prikazuje umeritveno krivuljo linearne odvisnosti masnega deleža zdravilne učinkovine od mase zdravilne učinkovine (v 5 µl) v raztopini standarda zdravilne učinkovine, ki smo jo uporabili za izračun vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini.

Preglednica VII: Masa zdravilne učinkovine, ki ustreza koncentraciji raztopine standardov zdravilne učinkovine

Koncentracija zdravilne učinkovine (mg/ml)	m (ng)	Masni delež ZU v raztopini standarda (%)
0,200	1000	2,0
0,150	750	1,5
0,100	500	1,0
0,080	400	0,8
0,060	300	0,6
0,075	250	0,5
0,045	150	0,3
0,030	100	0,2
0,015	50	0,1



Slika 11: Diagram linearne odvisnosti masnega deleža zdravilne učinkovine od mase zdravilne učinkovine za vse koncentracije raztopin standardov zdravilne učinkovine

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Zelo pogosto se zgodi, da primerjamo dve analizni metodi med sabo, tako da primerjamo rezultate vzorcev, ki vsebujejo različne količine analita, nečistot, sorodnih substanc, ali pa imamo različne vire vzorcev (različni dobavitelji). V tem primeru se lahko za statistično primerjavo rezultatov poslužujemo t-testa parov. T-testa parov se lahko poslužujemo tudi v primeru, če je vzorca količinsko dovolj le za enkratno meritve na vsaki analizni metodi. Če za statistično obdelavo uporabljamo test parov, ni potrebno, da je natančnost dveh analiznih metod enaka, privzamemo pa, da so diference med dvema analiznima metodama porazdeljene po normalni distribuciji. Podatki, ki jih uporabimo za test parov, so lahko enkratne meritve na vsaki analizni metodi ali pa gre za večkratne meritve. Pogoj, da lahko uporabimo test parov, je, da je na vsakem vzorcu narejeno enako število meritve z eno in drugo analizno metodo. T-test parov izračunamo po formuli (44):

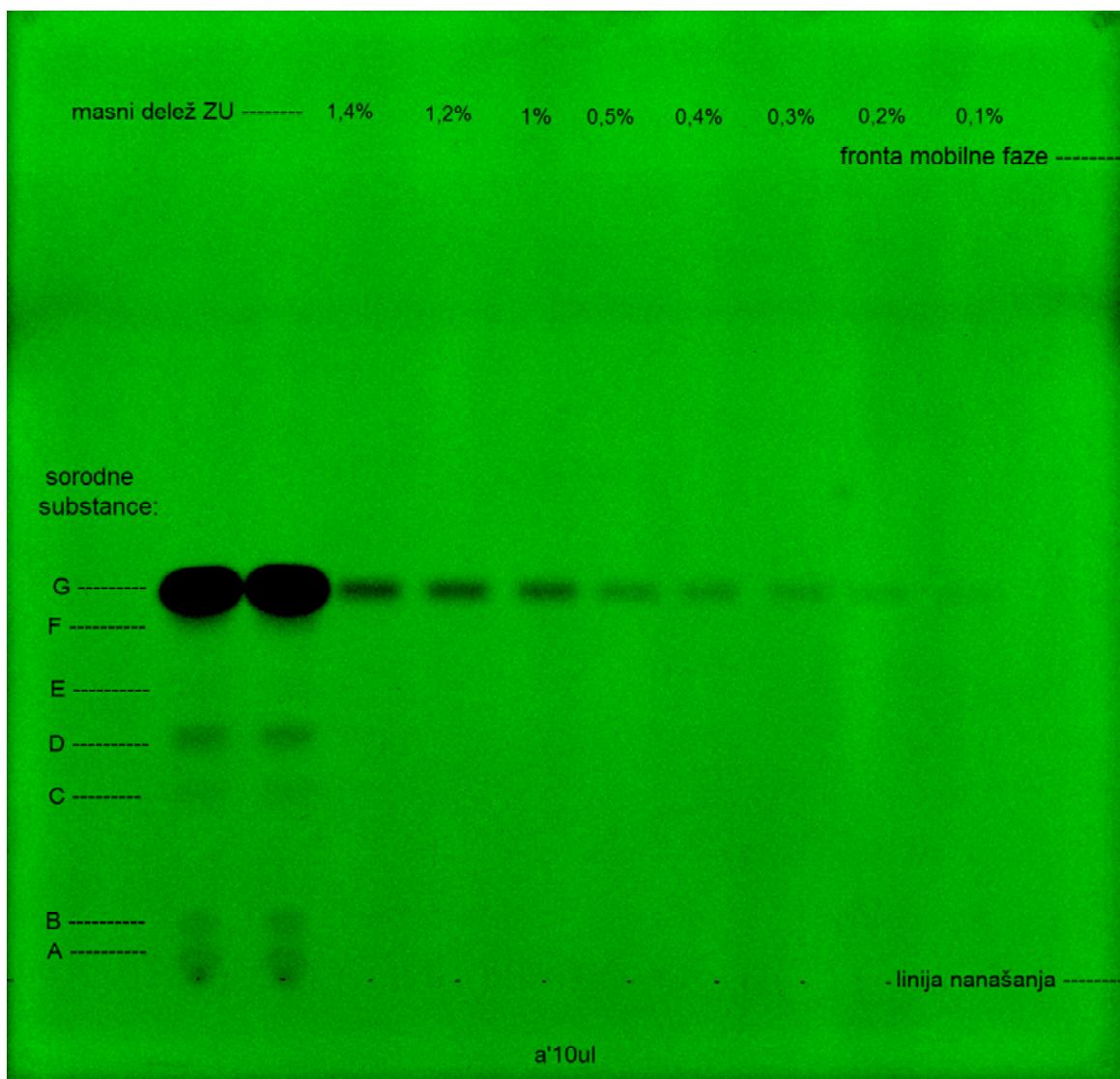
$$t = \frac{\bar{d} * \sqrt{n}}{S_d}$$

/3/

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA STACIONARNE FAZE

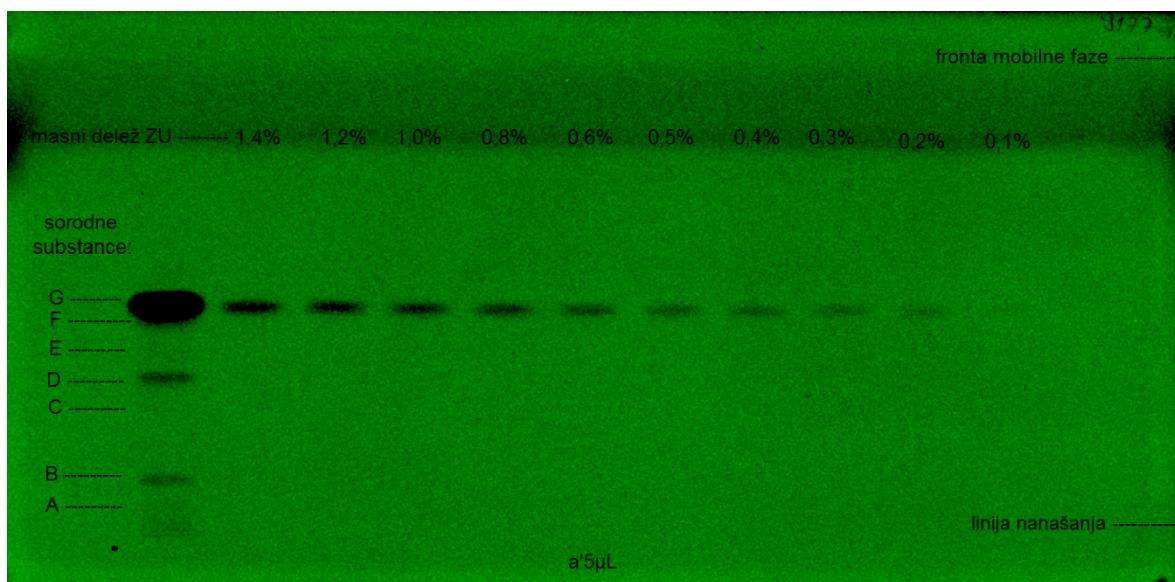
Trenutno uporabljena TLC metoda za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini in končnem farmacevtskem izdelku nam predpisuje uporabo kromatografske plošče TLC silikagelska 60 F₂₅₄, dimenzijske 20x20 cm, proizvajalca Merck. Velikost delcev na silikagelski TLC plošči je običajno v območju 5–40 µm. Posledica široke distribucije velikosti delcev je, da so lise na kromatogramu raztopine vzorca, ki pripadajo lisam sorodnih substanc na kromatografski plošči, zelo široke (»razvlečene«) in jih je zato zelo težko ocenjevati (zlasti, če je analitik neizkušen). To nam prikazuje slika 12.



Slika 12: Slika kromatografske plošče sorodnih substanc A, B, C, D, E, F, G zdravilne učinkovine – trenutno uporabljena TLC metoda

Na kromatografski plošči (slika 12) sta naneseni 2 raztopini vzorca zdravilne učinkovine (prvi in drugi nanos iz leve strani) in 8 standardov raztopin zdravilne učinkovine z masnim deležem zdravilne učinkovine 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % in 0,1 %. Na kromatogramu raztopine vzorca (slika 12) je prisotnih 6 dodatnih lis, ki pripadajo sorodnim substancam (označili smo jih kot lise A–F). Lisa, ki smo jo označili z oznako G, pripada zdravilni učinkovini. V nadaljevanju bomo statistično ovrednotili le vsebnost sorodni substanci iz lise B, ki jo bomo poimenovali sorodna substanca X, ter iz lise D, ki jo bomo poimenovali sorodna substanca Y.

Pri optimizaciji TLC metode za kvantitativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini in končnem farmacevtskem izdelku, smo nanesli raztopine na kromatografsko ploščo HPTLC silikagelsko 60 F₂₅₄, dimenziije 20 x 10 cm, proizvajalca Merck. Velikost delcev na silikagelski HPTLC plošči je običajno v območju 5–7 µm. To nam omogoča boljše ločevanje spojin. Lise, ki pripadajo lisam sorodnih substanc na kromatogramu raztopine vzorca, so bolj koncentrirane (niso »razvlečene«) in nam tako omogočajo kvantitativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc, kar prikazuje slika 13.



Slika 13: Slika kromatografske plošče sorodnih substanc A, B, C, D, E, F, G zdravilne učinkovine – optimizirana TLC metoda

Na kromatografski plošči (slika 13) je nanesena ena raztopina vzorca zdravilne učinkovine (prvi in drugi nanos iz leve strani) in 10 raztopin standarda zdravilne učinkovine z masnim deležem zdravilne učinkovine 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % in 0,1 %. Na kromatogramu raztopine vzorca (slika 13) je prisotnih 6 dodatnih lis, ki pripadajo sorodnim substancam (označili smo jih kot lise A–F). Lisa, ki smo jo označili z oznako G, pripada zdravilni učinkovini.

Sklepamo lahko, da ima izbira primerne stacionarne faze in posledično distribucija velikosti delcev na stacionarni fazni, velik vpliv na natančnost ugotavljanja vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini.

4.2 OPTIMIZACIJA NANAŠANJA

Trenutno uporabljena TLC metoda za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini in končnem farmacevtskem izdelku nam predpisuje nanašanje raztopin na kromatografsko ploščo v točki (slika 12). Volumen nanašanja, ki ga trenutno uporabljena TLC metoda predpisuje, je 10 µl. Pri optimizaciji TLC metode smo volumen nanašanja raztopin standardov in vzorcev zmanjšali, in sicer na 5 µl. Raztopine smo na kromatografsko ploščo nanašali v obliki črtice (slika 13) s pomočjo nanašalnika. Z uporabo nanašalnika smo izboljšali ponovljivost nanašanja, saj smo se s tem izognili vplivu človeškega faktorja pri nanašanju. Nenatančnost in neizkušenost analitika pri nanašanju je lahko vzrok za napačno ugotovitev vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini ali v končnem farmacevtskem izdelku. Z nanašanjem v črtico, s pomočjo nanašalnika, smo dosegli dobro ločevanje komponent vzorca, kar je posledica doseženih čim tanjših nanosov na stacionarni fazni. Zagotovili smo tudi, da je bila dolžina nanosa vseh raztopin enaka, kar je z ročnim nanašanjem v črtico težko zagotoviti. S tem, ko smo zmanjšali volumen nanašanja raztopin, smo se izognili prenasičenju stacionarne faze z naneseno raztopino. Prenasičenje stacionarne faze je lahko vzrok za slabo ločbo, če je koncentracija nanesene raztopine prevelika, posledično se lahko pojavi t. i. tailing (26, 28).

4.3 TLC IN HPLC SKLOPLJENA Z MASNIM DETEKTORJEM

V zdravilni učinkovini in končnem farmacevtskem izdelku se lahko pojavljajo sorodne substance, ki lahko vplivajo na vsebnost zdravilne učinkovine. S tem namenom je potrebno predpisati zahteve, katerim morajo zdravilne učinkovine in končni farmacevtski izdelki

ustrezati. Te zahteve so lahko predpisane v monografijah Ph. Eur. oziroma v drugih farmakopejah, ali pa v specifikacijah izdelka, kjer si zahteve postavi proizvajalec sam. Proizvajalec si v specifikaciji predpiše metode, s katerimi bo morebitne sorodne substance ovrednotil. Tudi v izbrani zdravilni učinkovini in končnem farmacevtskem izdelku smo zasledili prisotnost sorodnih substanc. TLC metoda je namenjena le ovrednotenju sorodnih substanc, ni pa mogoče s to metodo ugotoviti, za katere sorodne substance gre. To je izvedljivo le pri TLC, ki je sklopljena z masnim detektorjem. V preteklosti so to izvajali tako, da so sloj stacionarne faze, kjer se je nahajala lisa, izpraskali in ekstrahirali substanco z ustreznim topilom. Nato so raztopino injicirali na masni detektor. Danes se v ta namen uporablja TLC-MS vmesnik (slika 14), ki deluje polavtomatsko. Princip delovanja TLC-MS vmesnika je zelo preprost. TLC-MS vmesnik vsebuje posebej oblikovano glavo, ki je lahko v obliki kroga (za primer nanašanja v točko) ali pa je v obliki elipse (za primer nanašanja v črtico). Vsaka glava vmesnika vsebuje dve odprtini. Ena odprtina je namenjena topilu, ki pride v stik s stacionarno fazo in nam omogoči ekstrakcijo. Druga odprtina je namenjena temu, da lahko raztopino pošljemo na masni detektor ter vsebuje poseben filter, ki nam preprečuje, da bi delci sloja stacionarne faze prišli do masnega detektorja. Glavo vmesnika lahko s pomočjo vgrajenega laserja natančno namestimo neposredno na liso, ki se nahaja na stacionarni fazi. Glava vmesnika se nato spusti in iz stacionarne faze s pomočjo ustreznega topila ekstrahirja substanco, ki jo želimo identificirati. Ekstrahirana substanca nato on-line potuje v HPLC-MS sistem. Po vsaki opravljeni ekstrakciji se glava TLC-MS vmesnika avtomatsko očisti (44).



Slika 14: TLC-MS vmesnik (44)

Sorodne substance v izbrani zdravilni učinkovini in končnem farmacevtskem izdelku smo identificirati s TLC-MS metodo in jih s tem primerjali z rezultati HPLC metode. Ravno tako smo sorodne substance, ki smo jih ugotovili s HPLC metodo, identificirali s HPLC-MS. Posneli smo še HPLC-UV kromatograme. Tako smo identificirali in ugotovili, pri katerem retencijskem času (R_t) se nahaja določena sorodna substanca HPLC metode, s katero bomo primerjali rezultate, dobljene s TLC metodo. Na naneseni in razviti TLC stacionarni fazi smo s pomočjo TLC-MS vmesnika poskušali identificirati sorodne substance.

Ph. Eur. monografija zdravilne učinkovine navaja, da se v zdravilni učinkovini lahko pojavlja 10 znanih sorodnih substanc, in sicer sorodna substanca A, B, C, D, E, F, G, H, I in J. Za vsako sorodno substanco so navedene tudi molske mase in strukturne formule. Ph. Eur. monografija zdravilne učinkovine predpisuje, da je potrebno zdravilno učinkovino hraniti zaščiteno pred svetlobo. Če je zdravilna učinkovina izpostavljena svetlobi, lahko pride do razpada in posledično do povečane vsebnosti sorodnih substanc.

S pomočjo TLC-MS smo lahko identificirali dve znani sorodni substanci, ki smo ju poimenovali sorodna substanca X (gre za sorodno substanco B na sliki 15 in sliki 16) in sorodna substanca Y (gre za sorodno substanco D na sliki 15 in sliki 16). Molekulsko maso zdravilne učinkovine smo označili z M. Sorodni substanci X smo ugotovili molekulsko maso M-62,77, sorodni substanci Y pa smo ugotovili molekulsko maso M-43,05. Izbrani sorodni substanci imata tako v zdravilni učinkovini, kot v končnem farmacevtskem izdelku, največjo vsebnost. Sorodna substanca X se pri optimizirani TLC metodi pojavi pri R_f vrednosti 0,11, sorodna substanca Y se pojavi pri R_f vrednosti 0,33, kar je razvidno tudi iz slike 14. Pri validirani HPLC metodi se sorodna substanca X pojavi pri približnem R_t 18 minut in sorodna substanca Y pri približnem R_t 54 minut.

V nadaljevanju bomo statistično ovrednotili le vsebnost sorodne substance B, ki jo bomo poimenovali sorodna substanca X, ter sorodne substance D, ki jo bomo poimenovali sorodna substanca Y.

4.4 KVANTITATIVNO VREDNOTENJE VSEBNOSTI SORODNIH SUBSTANC V ZDRAVILNI UČINKOVINI

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati in umeritvene krivulje za kvantitativno vrednotenje vsebnosti sorodnih substanc v izbrani seriji zdravilne učinkovine. Na vsako kromatografsko ploščo smo nanesli eno serijo vzorca obravnavane zdravilne učinkovine. Za umeritveno krivuljo pri optimizirani TLC metodi smo izbrali polinomsko funkcijo. Vsako ploščo smo nato razvili v stekleni dvoprekatni kadički. Vsaka kromatografska plošča tako predstavlja svoj kromatografski sistem, za katerega veljajo različni pogoji analize. Zato imamo v nadaljevanju predstavljenih 14 umeritvenih krivulj. Naredili smo tudi primerjavo vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini, če bi za umeritveno krivuljo izbrali linearno regresijo. To smo izvedli tako, da smo v programu winCATS spremenili izbiro funkcije iz polinomske funkcije na linearno regresijo. Primerjavo smo naredili na isti kromatografski plošči in ugotovili vsebnost sorodnih substanc za vseh 14 serij vzorca zdravilne učinkovine s polinomsko funkcijo in linearno regresijo.

➤ Serija KRKA 1



Slika 15: Umeritvena krivulja za ugotavljanje sorodnih substanc v seriji KRKA 1

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0043x^2 + 12,385x + 77,059$ ($R^2 = 0,9986$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 9,131x + 487,72$ ($R^2 = 0,9913$)

Preglednica VIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 1 (polinomska funkcija)

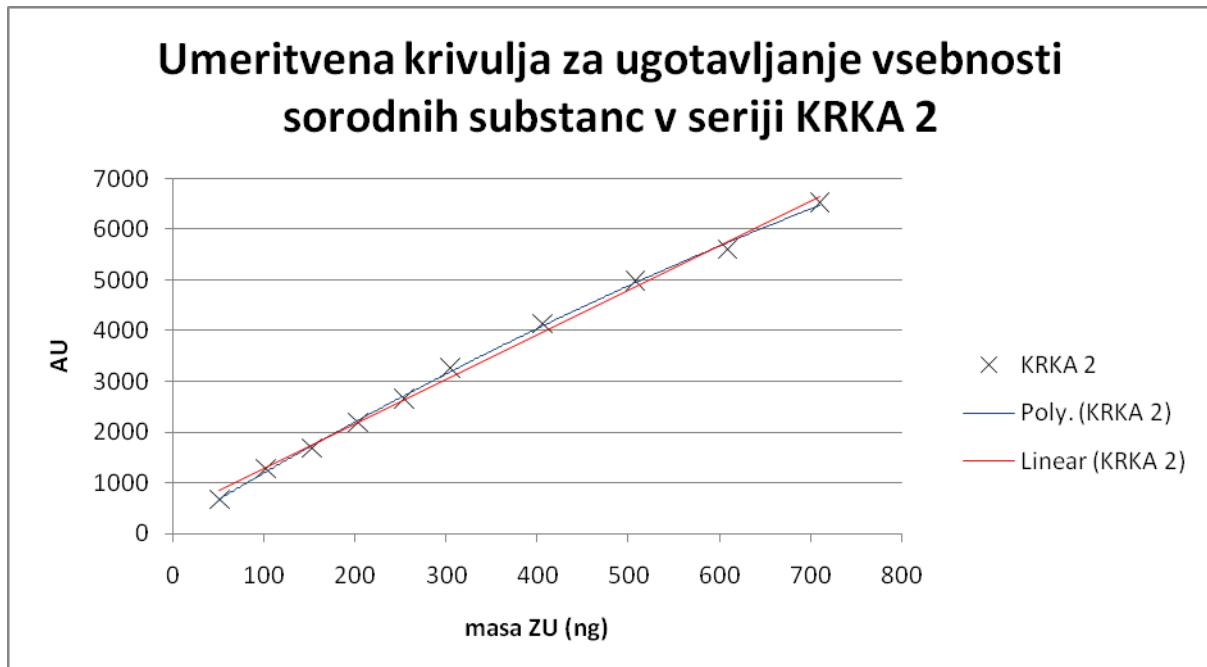
Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	7,37	0,01
B (X)	153,50	0,31
C	26,89	0,05
D (Y)	327,36	0,65
E	6,00	0,01
F	55,45	0,11

Preglednica IX: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 1 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	174,32	0,35
C	25,62	0,05
D (Y)	449,50	0,90
E	31,68	0,06

V preglednici VIII so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 1 z uporabo polinomske funkcije, v preglednici IX pa so predstavljeni rezultati za vsebnost sorodnih substanc z uporabo linearne regresije. Z uporabo polinomske funkcije smo ugotovili 6 sorodnih substanc, in sicer A, B, C, D, E in F. Na isti kromatografski plošči smo ugotovili vsebnost sorodnih substanc tudi z uporabo linearne regresije. Ugotovili smo 4 sorodne substance, in sicer B, C, D in E. V seriji KRKA 1 je imela največjo vsebnost sorodna substanca D, ne glede na to, ali smo za umeritveno krivuljo uporabili polinomsko funkcijo ali linearno regresijo.

➤ Serija KRKA 2



Slika 16: Umeritvena krivulja za ugotavljanje sorodnih substanc v seriji KRKA 2

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0027x^2 + 10,853x + 138,42$ ($R^2 = 0,9988$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,7981x + 397,8$ ($R^2 = 0,9956$)

Preglednica X: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 2 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	154,18	0,31
C	17,32	0,03
D (Y)	336,54	0,67
E	112,35	0,22
F	8,94	0,02

Preglednica XI: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 2 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	168,00	0,34
D (Y)	420,43	0,84
E	112,99	0,23

V preglednici X in XI so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 2 z uporabo polinomske funkcije in linearne regresije. V seriji KRKA 2 smo z uporabo polinomske funkcije lahko ugotovili 5 sorodnih substanc, in sicer sorodno substanco B, C, D, E in F, s pomočjo linearne regresije pa smo ugotovili 3 sorodne substance, in sicer B, D in E. V seriji KRKA 2 smo tako pri uporabi polinomske funkcije, kot pri uporabi linearne regresije, ugotovili največjo vsebnost sorodni substanci D.

➤ Serija KRKA 3



Slika 17: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 3

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0045x^2 + 11,658x + 59,37$ ($R^2 = 0,9986$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,2816x + 486,91$ ($R^2 = 0,989$)

Preglednica XII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 3 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	17,56	0,04
B (X)	163,96	0,33
C	12,10	0,02
D (Y)	263,13	0,53
E	52,48	0,10
F	29,41	0,06

Preglednica XIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 3 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	193,78	0,39
D (Y)	356,39	0,71
E	23,75	0,05

V preglednici XII so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 3 izračunani z uporabo polinomske funkcije, v preglednici XIII pa so predstavljeni rezultati za vsebnost sorodnih substanc, izračunani z uporabo linearne regresije. V vzorcu smo z uporabo polinomske funkcije ugotovili 6 sorodnih substanc, in sicer A, B, C, D, E in F, s pomočjo linearne regresije pa 3 sorodne substance, in sicer B, D in E. V obeh primerih (pri uporabi polinomske funkcije in linearne regresije) smo ugotovili, da ima največjo vsebnost sorodna substanca D.

➤ Serija KRKA 4



Slika 18: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 4

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0047x^2 + 11,819x + 54,674$ ($R^2 = 0,9989$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,25x + 505,16$ ($R^2 = 0,9881$)

Preglednica XIV: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 4 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	8,74	0,02
B (X)	147,65	0,30
C	36,86	0,07
D (Y)	299,58	0,60
E	99,49	0,20

Preglednica XV: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 4 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	169,34	0,34
D (Y)	425,71	0,85
E	93,57	0,19

Rezultati kvantitativnega vrednotenja za serijo KRKA 4 so predstavljeni v preglednici XIV (polinomska funkcija) in v preglednici XV (linearna regresija). V vzorcu KRKA 4 smo z uporabo polinomske funkcije ugotovili 5 sorodnih substanc (A, B, C, D in E), z uporabo linearne regresije smo ugotovili 3 sorodne substance (B, D in E). Pri umeritveni krivulji s polinomsko funkcijo in z linearno regresijo smo izračunali, da ima največjo vsebnost sorodna substanca D.

➤ Serija KRKA 5



Slika 19: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 5

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0052x^2 + 12,396x + 43,712$ ($R^2 = 0,9982$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,4843x + 537,47$ ($R^2 = 0,986$)

Preglednica XVI: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 5 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	16,14	0,03
B (X)	167,05	0,33
C	19,95	0,04
D (Y)	285,65	0,57
E	53,57	0,11
F	15,05	0,03

Preglednica XVII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 5 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	202,99	0,41
D (Y)	409,18	0,82
E	21,83	0,04

V preglednici XVI so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 5, ugotovljenih z uporabo polinomske funkcije, v preglednici XVII pa so predstavljeni rezultati za vsebnost sorodnih substanc, ugotovljenih z uporabo linearne regresije. Z uporabo polinomske funkcije smo ugotovili 6 sorodnih substanc, in sicer A, B, C, D, E in F. Na isti kromatografski plošči smo ugotovili vsebnost sorodnih substanc tudi s pomočjo linearne regresije. Ugotovili smo 3 sorodne substance, in sicer B, D in E. Pri obeh umeritvenih krivuljah smo ugotovili največjo vsebnost sorodne substance D.

➤ Serija KRKA 6



Slika 20: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 6

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0056x^2 + 12,876x + 55,248$ ($R^2 = 0,999$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,647x + 589,0$ ($R^2 = 0,9853$)

Preglednica XVIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 6 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	20,60	0,04
B (X)	139,71	0,28
C	44,19	0,09
D (Y)	261,33	0,52
E	95,62	0,19
F	41,03	0,08

Preglednica XIX: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 6 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	158,96	0,32
C	5,34	0,01
D (Y)	371,64	0,74
E	86,59	0,17

V vzorcu serije KRKA 6 smo z uporabo polinomske funkcije ugotovili 6 sorodnih substanc, in sicer A, B, C, D, E in F (preglednica XVIII). Na isti kromatografski plošči smo z uporabo linearne regresije ugotovili vsebnost 4 sorodnih substanc, in sicer B, C, D in E (preglednica XIX). Ne glede na to, ali smo uporabili za umeritveno krivuljo polinomsko funkcijo ali pa linearno regresijo, je največjo vsebnost imela sorodna substanca D.

➤ Serija KRKA 7



Slika 21: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 7

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0046x^2 + 11,910x + 67,658$ ($R^2 = 0,9988$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,4324x + 506,59$ ($R^2 = 0,9891$)

Preglednica XX: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 7 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	20,93	0,04
B (X)	177,59	0,36
C	13,04	0,03
D (Y)	285,28	0,57
E	54,34	0,11
F	23,34	0,05

Preglednica XXI: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 7 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	216,00	0,43
D (Y)	395,29	0,79
E	26,31	0,05
F	6,76	0,01

Za serijo KRKA 7 so v preglednici XX izračunani rezultati vsebnosti sorodnih substanc z uporabo polinomske funkcije, v preglednici XXI pa rezultati za izračunane vsebnosti sorodnih substanc z uporabo linearne regresije. Z uporabo polinomske funkcije smo ugotovili 6 sorodnih substanc (A, B, C, D, E in F), z uporabo linearne regresije pa smo ugotovili 4 sorodne substance (B, D, E in F). Pri obeh umeritvenih krivuljah smo izračunali, da ima največjo vsebnost v vzorcu sorodna substanca D.

➤ Serija KRKA 8



Slika 22: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 8

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0043x^2 + 11,537x + 208,9$ ($R^2 = 0,9989$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,2843x + 619,48$ ($R^2 = 0,9900$)

Preglednica XXII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 8 (polinomska funkcija)

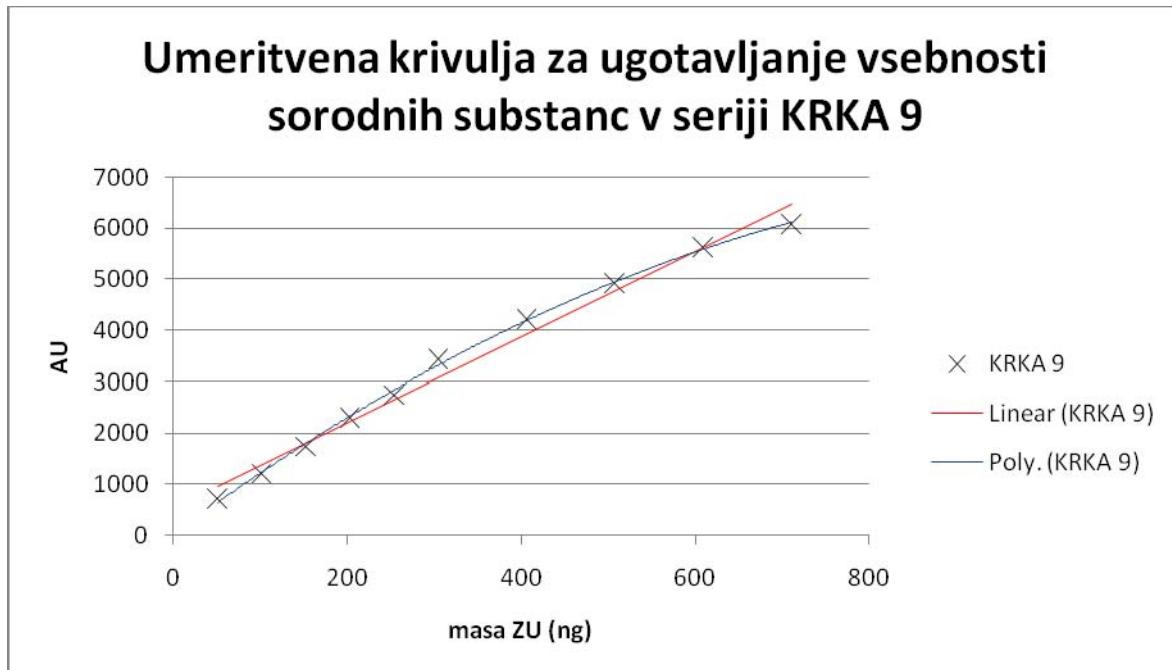
Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	127,16	0,25
C	12,84	0,03
D (Y)	262,84	0,53
E	73,29	0,15
F	17,48	0,03

Preglednica XXIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 8 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	135,93	0,27
D (Y)	352,37	0,70
E	55,30	0,11

V preglednici XXII so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 8 z uporabo polinomske funkcije, v preglednici XXIII so predstavljeni rezultati za vsebnost sorodnih substanc z uporabo linearne regresije. V vzorcu smo z uporabo polinomske funkcije ugotovili 5 sorodnih substanc, in sicer B, C, D, E in F. Na isti kromatografski plošči smo ugotovili vsebnost sorodnih substanc tudi s pomočjo linearne regresije. Ugotovili smo 3 sorodne substance, in sicer B, D in E. Sorodna substanca D je imela največjo vsebnost pri uporabi polinomske funkcije in pri uporabi linearne regresije.

➤ Serija KRKA 9



Slika 23: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 9

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0055x^2 + 12,515x + 20,868$ ($R^2 = 0,9987$)Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,343x + 547,39$ ($R^2 = 0,9844$)

Preglednica XXIV: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 9 (polinomska funkcija)

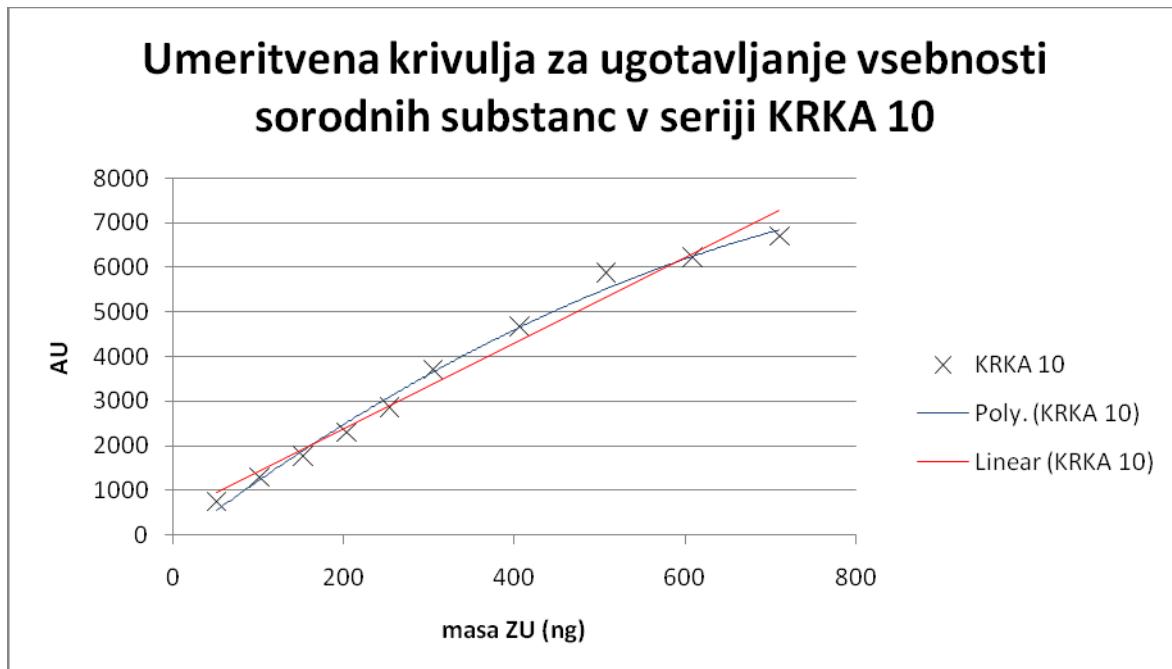
Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B	137,41	0,27
C	28,67	0,06
D	289,67	0,58
E	101,25	0,20
F	41,61	0,08

Preglednica XXV: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 9 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B	155,43	0,31
D	426,72	0,85
E	95,52	0,19

Rezultati kvantitativnega vrednotenja sorodnih substanc za serijo KRKA 9 so predstavljeni v preglednici XXIV (z uporabo polinomske funkcije) in v preglednici XXV (z uporabo linearne regresije). V vzorcu smo ugotovili 5 sorodnih substanc z uporabo polinomske funkcije (B, C, D, E in F) in 3 sorodne substance (B, D in E) z uporabo linearne regresije. V obeh primerih smo ugotovili največjo vsebnost sorodne substance D.

➤ Serija KRKA 10



Slika 24: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 10

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0066x^2 + 14,579x - 173,38$ ($R^2 = 0,9923$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 9,5946x + 455,72$ ($R^2 = 0,977$)

Preglednica XXVI: Vsebnost sorodnih substanc v seriji KRKA 10 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	21,61	0,04
B (X)	163,28	0,33
C	38,32	0,08
D (Y)	291,34	0,58
E	81,61	0,16
F	21,96	0,04

Preglednica XXVII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 10 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	199,01	0,40
D (Y)	427,41	0,85
E	65,03	0,13

V preglednici XXVI so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 10 z uporabo polinomske funkcije, v preglednici XXVII pa so predstavljeni rezultati za vsebnost sorodnih substanc z uporabo linearne regresije. V seriji KRKA 10 smo z uporabo polinomske funkcije ugotovili 6 sorodnih substanc, in sicer sorodno substanco A, B, C, D, E in F. Na isti kromatografski plošči smo ugotovili vsebnost sorodnih substanc tudi s pomočjo linearne regresije. Ugotovili smo 3 sorodne substance, in sicer sorodne substance B, D in E. V obeh primerih smo ugotovili, da ima največjo vsebnost sorodna substanca D.

➤ Serija KRKA 11



Slika 25: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 11

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0055x^2 + 12,969x - 26,645$ ($R^2 = 0,9989$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,8012x + 499,38$ ($R^2 = 0,9861$)

Preglednica XXVIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 11 (polinomska funkcija)

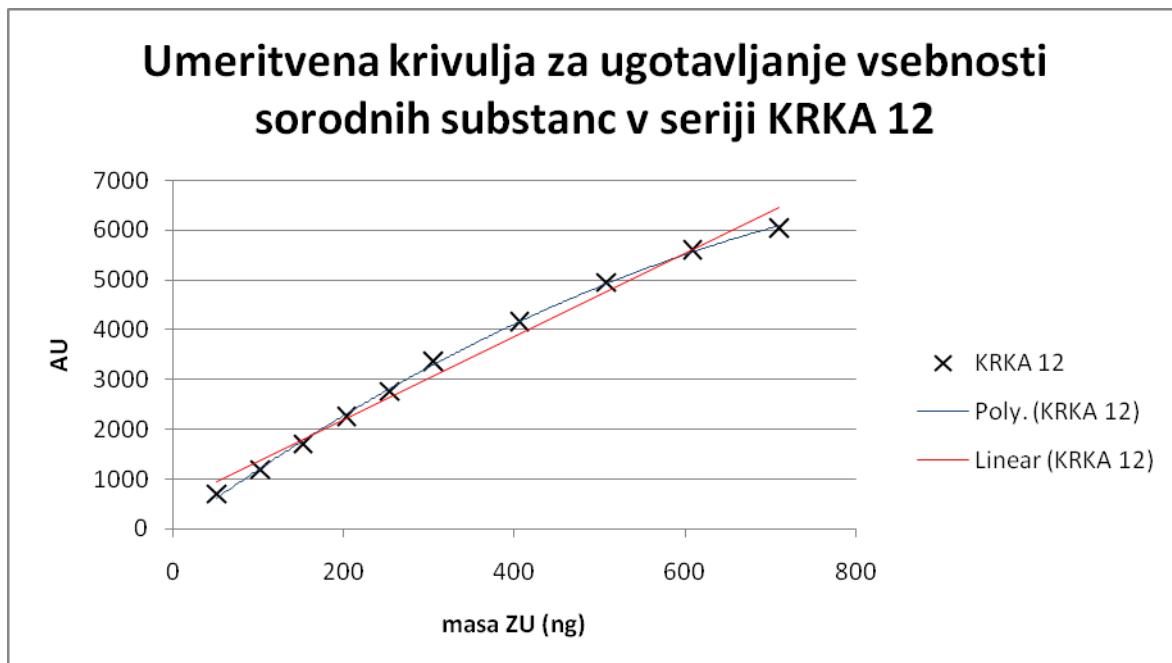
Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	22,93	0,05
B (X)	139,99	0,28
D (Y)	259,65	0,52
E	87,26	0,17
F	40,79	0,08

Preglednica XXIX: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 11 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	160,62	0,32
D (Y)	421,98	0,84
E	72,26	0,14

V preglednici XXVIII so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 11, izračunani z uporabo polinomske funkcije, v preglednici XXIX pa so predstavljeni rezultati za vsebnost sorodnih substanc, izračunani z uporabo linearne regresije. Z uporabo polinomske funkcije smo ugotovili 5 sorodnih substanc, in sicer A, B, D, E in F. Na isti kromatografski plošči smo ugotovili vsebnost sorodnih substanc tudi s pomočjo linearne regresije. Ugotovili smo 3 sorodne substance, in sicer B, D in E. Največjo vsebnost je imela sorodna substanca D.

➤ Serija KRKA 12



Slika 26: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 12

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0056x^2 + 12,522x - 3,2194$ ($R^2 = 0,9991$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,3419x + 524,32$ ($R^2 = 0,9848$)

Preglednica XXX: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 12 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	13,43	0,03
B (X)	139,14	0,29
C	26,60	0,05
D (Y)	278,77	0,56
E	101,41	0,20
F	41,62	0,08

Preglednica XXXI: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 12 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	158,62	0,32
D (Y)	407,38	0,81
E	95,89	0,19

V preglednici XXX in XXXI so predstavljeni rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 12 z uporabo polinomske funkcije in linearne regresije. V seriji KRKA 12 smo z uporabo polinomske funkcije ugotovili 6 sorodnih substanc (A, B, C, D, E in F), z uporabo linearne regresije pa smo ugotovili 3 sorodne substance (B, D in E). Sorodna substanca D je imela največjo vsebnost tako pri polinomski funkciji, kot pri linearni regresiji.

➤ Serija KRKA 13



Slika 27: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 13

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0043x^2 + 11,689x + 121,93$ ($R^2 = 0,9949$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,4411x + 531,89$ ($R^2 = 0,9865$)

Preglednica XXXII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 13 (polinomska funkcija)

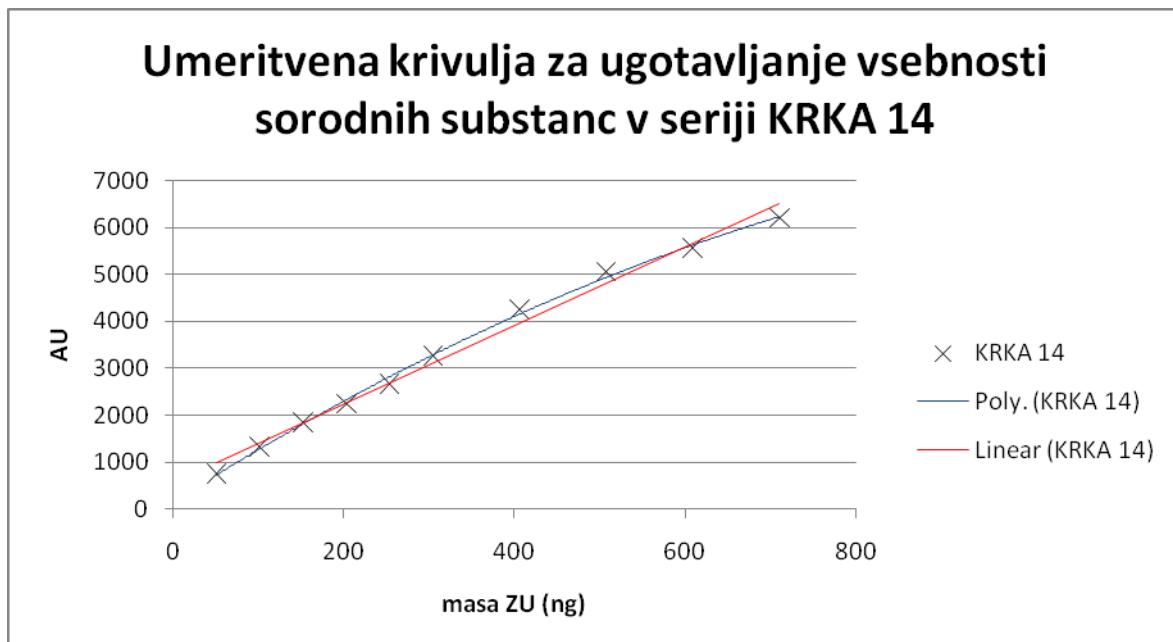
Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	5,10	0,01
B (X)	161,13	0,32
C	39,13	0,08
D (Y)	283,48	0,57
E	83,42	0,17

Preglednica XXXIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 13 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	186,86	0,37
C	6,34	0,01
D (Y)	382,08	0,76
E	70,25	0,14

Rezultati vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 13 z uporabo polinomske funkcije so predstavljeni v preglednici XXXII, rezultati za vsebnost sorodnih substanc z uporabo linearne regresije pa v preglednici XXXIII. V vzorcu KRKA 13 smo ugotovili 5 sorodnih substanc z uporabo polinomske funkcije, in sicer sorodno substanco A, B, C, D in E. Z uporabo linearne regresije smo ugotovili 4 sorodne substance, in sicer sorodno substanco B, C, D in E. Največjo vsebnost smo ugotovili sorodni substanci D.

➤ Serija KRKA 14



Slika 28: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA 14

Enačba premice (polinomska funkcija): $y = -0,0043x^2 + 11,611x + 149,64$ ($R^2 = 0,998$)

Enačba premice (linearna funkcija): $y = 8,3707x + 558,62$ ($R^2 = 0,9894$)

Preglednica XXXIV: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 14 (polinomska funkcija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	77,90	0,16
B (X)	108,49	0,22
C	24,08	0,05
D (Y)	254,85	0,51
E	74,16	0,15

Preglednica XXXV: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA 14 (linearna regresija)

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
A	62,31	0,12
B (X)	107,67	0,22
D (Y)	338,00	0,68
E	56,84	0,11

Rezultati kvantitativnega vrednotenja za serijo KRKA 14 z uporabo polinomske funkcije so predstavljeni v preglednici XXXIV, v preglednici XXXV pa so predstavljeni rezultati kvantitativnega vrednotenja z uporabo linearne regresije. Z uporabo polinomske funkcije smo ugotovili 5 sorodnih substanc, in sicer A, B, C, D in E. Z uporabo linearne regresije smo ugotovili 4 sorodne substance, in sicer A, B, D in E. V obeh primerih je imela največjo vsebnost sorodna substanca D.

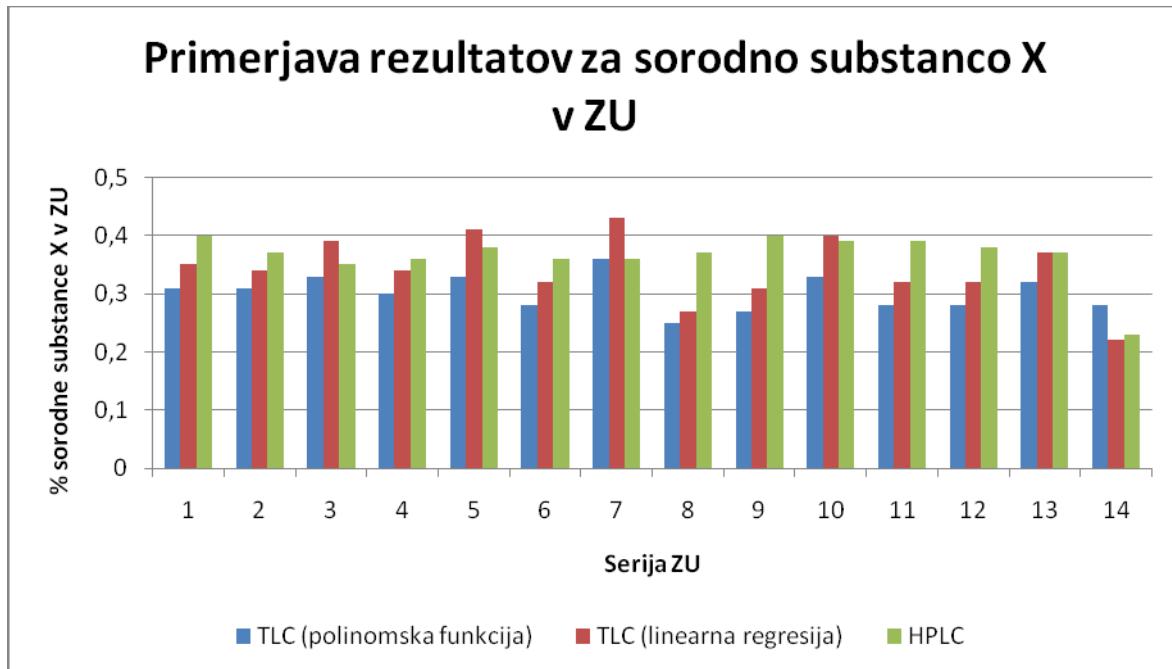
Rezultati primerjave za sorodno substanco X so predstavljeni v preglednici XXXVI, rezultati primerjave za sorodno substanco Y pa so predstavljeni v preglednici XXXVII.

Preglednica XXXVI: Primerjava rezultatov za sorodno substanco X (lisa z oznako B)

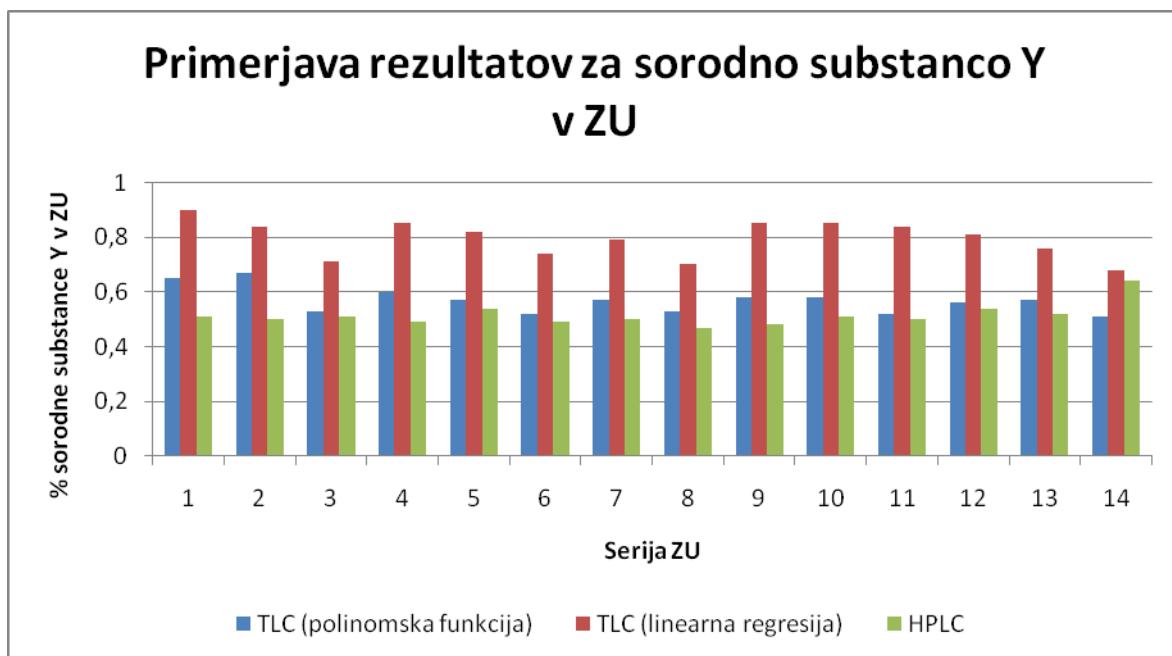
SERIJA	SORODNA SUBSTANCA X		
	TLC – polinomska funkcija (%)	TLC – linearna regresija (%)	HPLC (%)
KRKA 1	0,31	0,35	0,40
KRKA 2	0,31	0,34	0,37
KRKA 3	0,33	0,39	0,35
KRKA 4	0,30	0,34	0,36
KRKA 5	0,33	0,41	0,38
KRKA 6	0,28	0,32	0,36
KRKA 7	0,36	0,43	0,36
KRKA 8	0,25	0,27	0,37
KRKA 9	0,27	0,31	0,40
KRKA 10	0,33	0,40	0,39
KRKA 11	0,28	0,32	0,39
KRKA 12	0,28	0,32	0,38
KRKA 13	0,32	0,37	0,37
KRKA 14	0,28	0,22	0,23

Preglednica XXXVII: Primerjava rezultatov za sorodno substanco Y (lisa z oznako D)

SERIJA	SORODNA SUBSTANCA Y		
	TLC – polinomska funkcija (%)	TLC – linearna regresija (%)	HPLC (%)
KRKA 1	0,65	0,90	0,51
KRKA 2	0,67	0,84	0,50
KRKA 3	0,53	0,71	0,51
KRKA 4	0,60	0,85	0,49
KRKA 5	0,57	0,82	0,54
KRKA 6	0,52	0,74	0,49
KRKA 7	0,57	0,79	0,50
KRKA 8	0,53	0,70	0,47
KRKA 9	0,58	0,85	0,48
KRKA 10	0,58	0,85	0,51
KRKA 11	0,52	0,84	0,50
KRKA 12	0,56	0,81	0,54
KRKA 13	0,57	0,76	0,52
KRKA 14	0,51	0,68	0,64



Slika 29: Grafični prikaz primerjave vsebnosti sorodne substance X v seriji zdravilne učinkovine



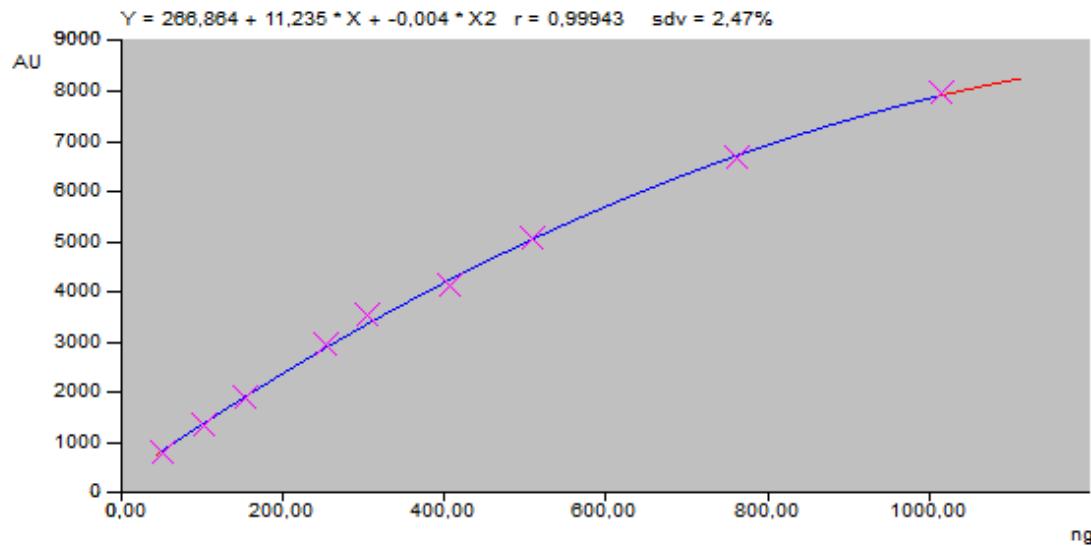
Slika 30: Grafični prikaz primerjave vsebnosti sorodne substance Y v seriji zdravilne učinkovine

Pri vseh serijah zdravilne učinkovine smo pri uporabi umeritvene krivulje s polinomsko funkcijo ugotovili večje število sorodnih substanc, kot pa pri uporabi umeritvene krivulje z linearno regresijo. Vzrok, da smo pri uporabi linearne regresije ugotovili manjše število sorodnih substanc, je zaradi odseka na ordinatni osi. Sorodne substance, ki so imele zelo majhno površino vrhov, zaradi odseka na ordinatni osi nismo mogli ovrednotiti pri uporabi linearne regresije. Na kromatografski plošči imamo nanesene raztopine standarda zdravilne učinkovine v zelo širokem koncentracijskem območju, zato se je izkazalo, da je v tem primeru bolj primeren način za umeritveno krivuljo polinomska funkcija. Z ožanjem koncentracijskega območja raztopin standardov zdravilne učinkovine, bi bila primerna tudi umeritvena krivulja z uporabo linearne regresije. V tem primeru bi lahko ugotovili tudi vsebnost sorodnih substanc, ki jih nismo mogli ovrednotiti. Pri vseh serijah zdravilne učinkovine, z izjemo serije KRKA 14, smo z uporabo linearne regresije ugotovili višje vsebnosti sorodne substance X. Ravno tako smo pri vseh serijah zdravilne učinkovine z uporabo linearne regresije ugotovili višje vsebnost sorodne substance Y. Vzrok za to je v izbiri umeritvene krivulje. Optimizirano TLC metodo smo preizkusili tudi na končnem farmacevtskem izdelku. Ker imamo tudi pri končnem farmacevtskem izdelku raztopine standarda zdravilne učinkovine v širokem koncentracijskem območju, smo za umeritveno krivuljo uporabili le polinomsko funkcijo.

4.5 KVANTITATIVNO VREDNOTENJE VSEBNOSTI SORODNIH SUBSTANC V KONČNEM FARMACEVTSKEM IZDELKU

Optimizirano TLC metodo smo preizkusili tudi na končnem farmacevtskem izdelku, ki vsebuje isto zdravilno učinkovino. Uporabili smo isto stacionarno fazo in mobilno fazo kot za zdravilno učinkovino. V nadaljevanju so predstavljeni rezultati in umeritvene krivulje za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v izbranem končnem farmacevtskem izdelku. Na kromatografske plošče smo nanesli različne serije vzorcev obravnavanega končnega farmacevtskega izdelka. V eksperimentalnem delu smo uporabili 6 različnih vzorcev končnega farmacevtskega izdelka. Na vsako kromatografsko ploščo smo nanesli 2 seriji vzorca končnega farmacevtskega izdelka. Kot umeritveno krivuljo smo glede na ugotovitve pri vrednotenju vsebnosti sorodnih substanc v serijah zdravilne učinkovine izbrali polinomsko funkcijo.

➤ Serija KRKA TBL 1 in serija KRKA TBL 2



Slika 31: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA TBL 1 in KRKA TBL 2 končnega farmacevtskega izdelka

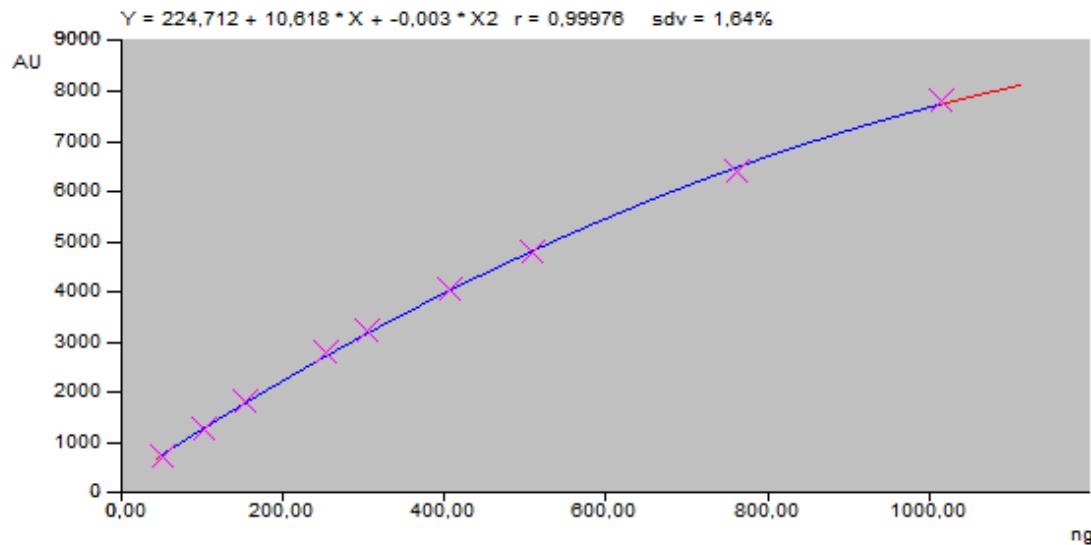
Preglednica XXXVIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA TBL 1

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	159,82	0,32
C	22,20	0,04
D (Y)	275,32	0,55
E	98,44	0,20
F	21,99	0,04

Preglednica XXXIX: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA TBL 2

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	149,45	0,30
C	11,21	0,02
D (Y)	281,14	0,56
E	81,63	0,16
F	22,69	0,05

➤ Serija KRKA TBL 3 in serija KRKA TBL 4



Slika 32: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA TBL 3 in KRKA TBL 4 končnega farmacevtskega izdelka

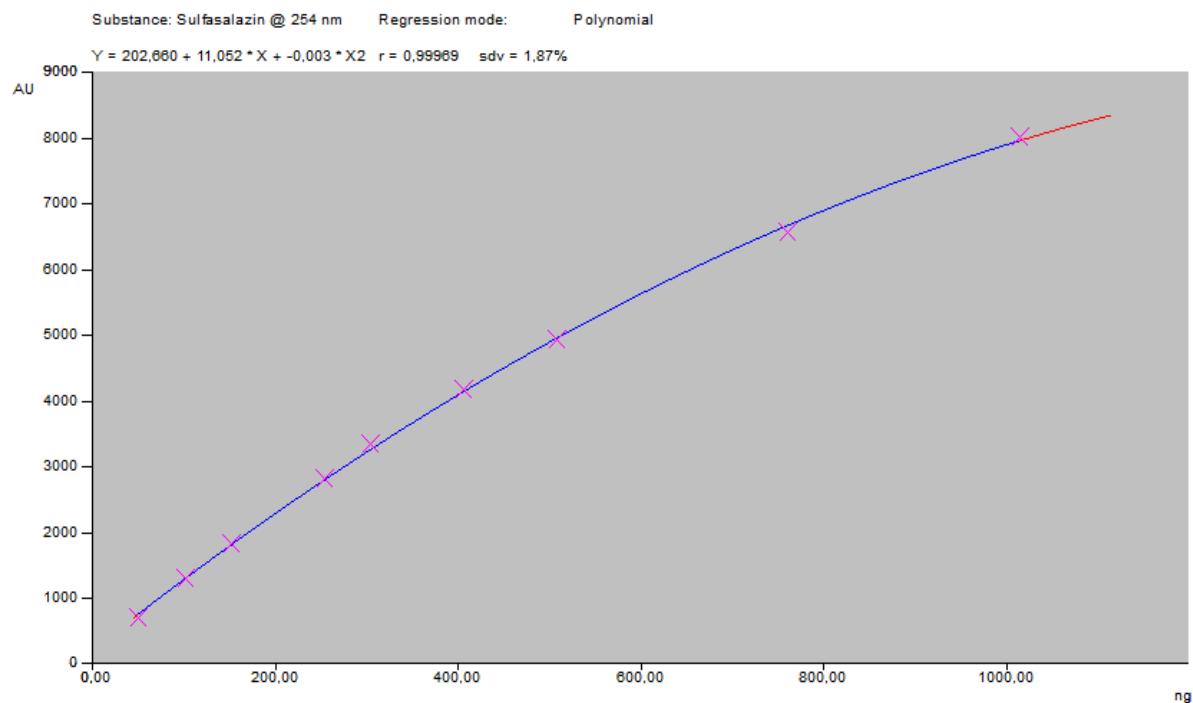
Preglednica XL: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA TBL 3

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	160,11	0,32
D (Y)	293,99	0,59
E	76,65	0,15
F	27,20	0,05

Preglednica XLI: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA TBL 4

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	162,69	0,33
C	15,85	0,03
D (Y)	293,35	0,59
E	81,65	0,16
F	49,04	0,10

➤ Serija KRKA TBL 5 in KRKA TBL 6



Slika 33: Umeritvena krivulja za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v seriji KRKA TBL 5 in KRKA TBL 6 končnega farmacevtskega izdelka

Preglednica XLII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA TBL 5

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	154,26	0,31
D (Y)	303,69	0,61
E	87,68	0,18
F	34,81	0,07

Preglednica XLIII: Vsebnost sorodnih substanc za serijo KRKA TBL 6

Oznaka sorodne substance	Masa sorodne substance (ng)	% sorodne substance
B (X)	170,41	0,34
D (Y)	331,19	0,66
E	97,06	0,19
F	24,54	0,05

V vseh serijah končnega farmacevtskega izdelka smo ugotovili prisotnost sorodnih substanc. V seriji KRKA TBL 1, KRKA TBL 2 in KRKA TBL 4 smo ugotovili 5 sorodnih substanc. V seriji KRKA TBL 3, KRKA TBL 5 in KRKA TBL 6 smo ugotovili prisotnost 4 sorodnih substanc. V vseh serijah končnega farmacevtskega izdelka je imela največjo vsebnost sorodna substanca D, kar potrjuje tudi trend ugotovitve vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini. Sklepamo lahko, da se tekom proizvodnje končnega farmacevtskega izdelka vsebnost sorodne substance D bistveno ne spremeni. Dokazali smo, da je z optimizirano TLC metodo mogoče vrednotiti vsebnost sorodnih substanc tudi v končnem farmacevtskem izdelku.

4.6 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV – t-TEST PAROV

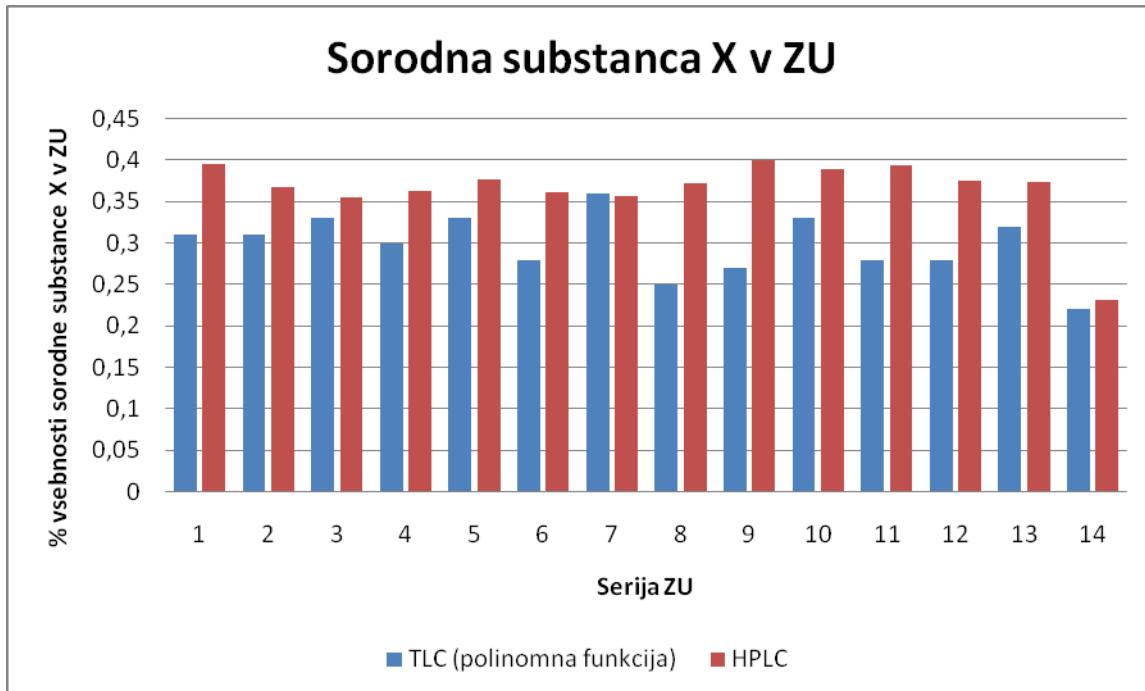
V preglednici XLIV so zbrani rezultati vsebnosti sorodne substance X v zdravilni učinkovini, v preglednici XLV pa so zbrani rezultati vsebnosti sorodne substance Y v zdravilni učinkovini. Za statistično obdelavo rezultatov smo uporabili t-test parov, ki smo ga izračunali po formuli oziroma enačbi 2 na strani 27. Za test parov smo se odločili, ker smo imeli na razpolago le eno meritev za vsako serijo zdravilne učinkovine z validirano farmakopejsko HPLC metodo. Pri optimizirani TLC metodi smo za vsako serijo zdravilne učinkovine pripravili eno paralelko vzorca. Tako so bili izpolnjeni pogoji, da smo za statistično obdelavo dobljenih rezultatov uporabili t-test parov. Vrednotili smo 14 serij zdravilne učinkovine, ki so bile proizvedene neodvisno ena od druge, vsebnosti sorodnih substanc v serijah zdravilne učinkovine pa nismo poznali. To je bil še eden izmed razlogov, da smo se odločili za t-test parov. V vsaki izmed 14-ih serij zdravilne učinkovine smo ugotovili vsebnost sorodnih substanc. Statistično smo primerjali med sabo le vsebnost sorodne substance X in vsebnost sorodne substance Y. To je skupaj 28 meritev, ki smo jih primerjali z rezultati HPLC metode. Tabelarična vrednost za dvostranski t-test pri izbranih statističnih pogojih ($p = 0,05$; frekvenca 27) je 2,365. HPLC in optimizirana TLC metoda med sabo ne dajeta statistično pomembnih razlik, če je izračunana vrednost t-testa parov manjša od tabelaričnih vrednosti. Izračunana vrednost t-testa parov je bila 0,440. Ta vrednost je nižja od kritične tabelarične vrednosti za t-test parov. Torej je test parov pokazal, da sta metodi med sabo statistično primerljivi in med njima ne obstaja pomembna razlika.

Preglednica XLIV: Rezultati za sorodno substanco X v zdravilni učinkovini

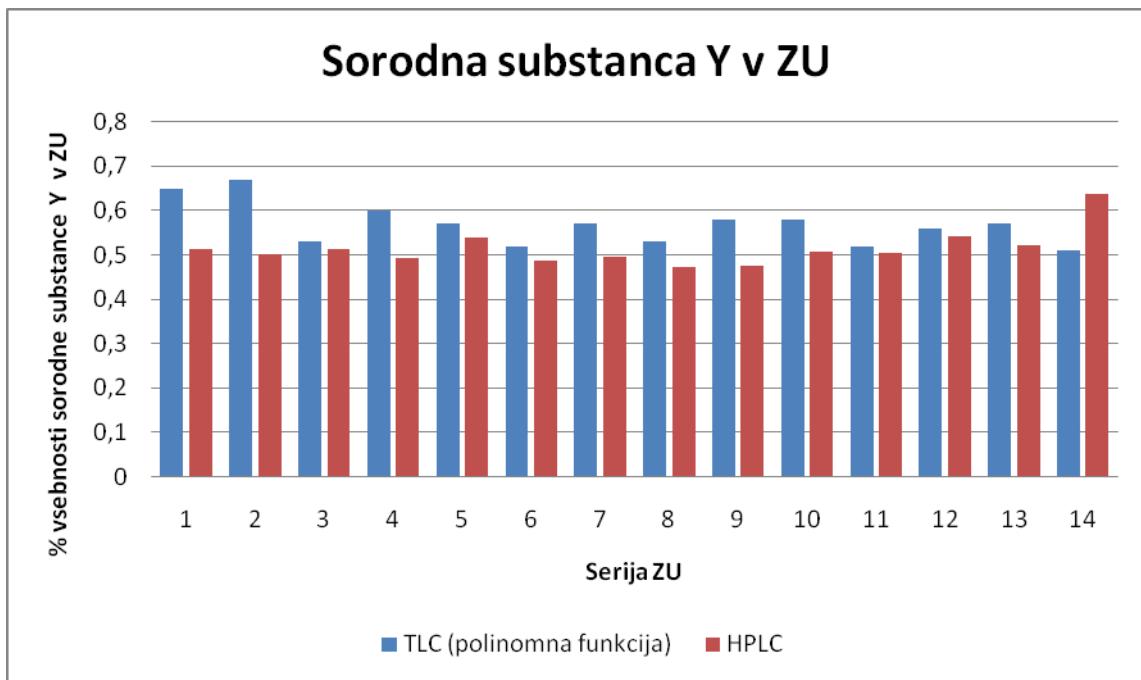
SORODNA SUBSTANCA X			
SERIJA	TLC – polinomska funkcija (%)	HPLC (%)	ABSOLUTNA RAZLIKA (%)
KRKA 1	0,31	0,40	- 0,09
KRKA 2	0,31	0,37	- 0,06
KRKA 3	0,33	0,35	- 0,02
KRKA 4	0,30	0,36	- 0,06
KRKA 5	0,33	0,38	- 0,05
KRKA 6	0,28	0,36	- 0,08
KRKA 7	0,36	0,36	0,00
KRKA 8	0,25	0,37	- 0,12
KRKA 9	0,27	0,40	- 0,13
KRKA 10	0,33	0,39	- 0,06
KRKA 11	0,28	0,39	- 0,11
KRKA 12	0,28	0,38	- 0,10
KRKA 13	0,32	0,37	- 0,05
KRKA 14	0,22	0,23	- 0,01

Preglednica XLV: Rezultati za sorodno substanco Y v zdravilni učinkovini

SERIJA	SORODNA SUBSTANCA Y		
	TLC – polinomska funkcija (%)	HPLC (%)	ABSOLUTNA RAZLIKA (%)
KRKA 1	0,65	0,51	0,14
KRKA 2	0,67	0,50	0,17
KRKA 3	0,53	0,51	0,02
KRKA 4	0,60	0,49	0,11
KRKA 5	0,57	0,54	0,03
KRKA 6	0,52	0,49	0,03
KRKA 7	0,57	0,50	0,07
KRKA 8	0,53	0,47	0,06
KRKA 9	0,58	0,48	0,10
KRKA 10	0,58	0,51	0,07
KRKA 11	0,52	0,50	0,02
KRKA 12	0,56	0,54	0,02
KRKA 13	0,57	0,52	0,05
KRKA 14	0,51	0,64	- 0,13



Slika 34: Grafični prikaz primerjave vsebnosti sorodne substance X v zdravilni učinkovini



Slika 35: Grafični prikaz primerjave vsebnosti sorodne substance Y v zdravilni učinkovini

5 ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo razvijali metodo za kvantitativno ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini s TLC metodo. Trenutno uporabljeni TLC metoda nam omogoča le semi-kvantitativno ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini in končnem farmacevtskem izdelku. V monografiji zdravilne učinkovine v Ph. Eur. je predpisana metoda za ugotavljanje vsebnosti sorodnih substanc HPLC metoda. Vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini, ugotovljenih z novo optimizirano TLC metodo, smo primerjali s HPLC metodo. Metodo smo preizkusili tudi na končnem farmacevtskem izdelku, ki vsebuje isto zdravilno učinkovino.

Pri optimizirani TLC metodi smo stacionarno fazo spremenili. Namesto TLC 60 F₂₅₄ silikagelske plošče smo uporabili HPTLC 60 F₂₅₄ silikagelsko ploščo, ki ima ožjo distribucijo velikosti delcev sloja adsorbenta. S tem smo dosegli boljšo ločbo komponent vzorca in natančnost vrednotenja vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini in v končnem farmacevtskem izdelku.

Dosedanja TLC metoda predpisuje nanašanje raztopin v točko, volumen nanašanja je 10 µl. Pri optimizirani TLC metodi smo volumen nanašanja zmanjšali na 5 µl, raztopine standardov in vzorcev smo na kromatografsko ploščo nanašali v črtici z uporabo nanašalnika. S tem smo izboljšali ponovljivost nanašanja in ločevanje komponent vzorca na kromatografski plošči.

Na stacionarno fazo smo nanašali raztopine vzorca zdravilne učinkovine in standarda zdravilne učinkovine. Na razpolago smo imeli 14 serij zdravilne učinkovine. Standard zdravilne učinkovine smo uporabili zaradi nedostopnosti standardov sorodnih substanc. Po razvijanju kromatografske plošče smo v prvi fazi s pomočjo TLC-MS identificirali dve izmed sorodnih substanc, ki se v zdravilni učinkovini in v končnem farmacevtskem izdelku pojavljata v najvišji koncentraciji. Označili smo ju kot sorodni substanci X in Y. Ravno tako smo s pomočjo HPLC-MS identificirali sorodne substance, ki smo jih ugotovili s HPLC metodo. Nato smo posneli še HPLC-UV kromatograme. Tako smo lahko z gotovostjo trdili, da pri obeh analiznih metodah vrednotimo in primerjamo rezultate za isto sorodni substanci.

V nadaljevanju smo kromatografske plošče kvantitativno vrednotili z uporabo optimizirane TLC metode. Kvantitativno vrednotenje smo izvajali z uporabo denzitometra. Ker smo na kromatografski plošči imeli nanesene raztopine standarda zdravilne učinkovine v širokem koncentracijskem območju, smo za umeritveno krivuljo izbrali polinomsko funkcijo. Na isti kromatografski plošči smo za umeritveno krivuljo izbrali tudi linearno regresijo in primerjali rezultate vsebnosti sorodnih substanc. Dokazali smo, da je v našem koncentracijskem območju raztopin standardov zdravilne učinkovine, bolj primerna uporaba umeritvene krivulje s polinomsko funkcijo, saj smo lahko ugotovili vsebnost večjega števila sorodnih substanc. Z ožanjem koncentracijskega območja raztopin standardov zdravilne učinkovine bi najverjetneje tudi pri uporabi linearne regresije lahko ugotovili vsebnost sorodnih substanc v zdravilni učinkovini, ki so prisotne v majhnih koncentracijah.

Optimizirano TLC metodo smo preizkusili tudi na končnem farmacevtskem izdelku, ki vsebuje isto zdravilno učinkovino, in vsebnost sorodnih substanc vrednotili tudi v njem. Dokazali, da je metoda kvantitativnega ugotavljanja vsebnosti sorodnih substanc mogoča tudi v končnem farmacevtskem izdelku.

Rezultate vsebnosti sorodnih substanc v zdravilni učinkovini pri optimizirani TLC metodi in rezultate, dobljene pri HPLC metodi, smo tudi statistično ovrednotili. Med sabo smo primerjali dve različni metodi, za kateri smo imeli le eno meritev oziroma eno paralelko in so bili vzorci proizvedeni neodvisno eden od drugega. Zato smo za statistično primerjavo uporabili t-test parov. S testom parov smo dokazali, da sta metodi (validirana HPLC metoda in optimizirana TLC metoda) med sabo statistično primerljivi in med njima ne obstaja pomembna razlika. Za uporabo optimizirane TLC metode v praksi bi bilo potrebno metodo še validirati.

6 LITERATURA

1. Ferenczi-Fodor K, Végh Z, Renger B: Thin-layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals. Trends in analytical chemistry 2006; 25: 778–779
2. Reich E, Schibli A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 11–19
3. European Pharmacopoeia, 7th Edition: 2.2.27. Thin Layer Chromatography, Council of Europe, Strasbourg, 2011; 42–43
4. www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk6770/kromatinz1.pdf (dostopno september 2012)
5. Berezkin VG: Contributions from N.A. Izmailov and M.S. Schraiber to the Development of Thin-Layer Chromatography (on the 70th Anniversary of the Publication of the First Paper on Thin-Layer Chromatography). Journal of Analytical Chemistry 2008; 63: 400–404
6. Wall PE: Thin-Layer Chromatography A modern practical approach, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005; 2–4
7. Reich E, Schibli A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 19–21
8. <https://sites.google.com/site/chernyavskogo5en/home> (dostopno september 2012)
9. Hill J, Striegl MF: Thin-Layer Chromatography For Binding Media Analysis – Scientific tools for conservation, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, 1996: 13–15
10. Hahn-Deinstrop E: Applied Thin-Layer chromatography – Best Practice and Avoidance of Mistakes, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007; 4–6
11. Reich E, Schibli A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 42–45
12. Hahn-Deinstrop E: Applied Thin-Layer chromatography – Best Practice and Avoidance of Mistakes, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007; 16–19
13. Wall PE: Thin-Layer Chromatography A modern practical approach, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005; 7–12
14. Kowalska T, Sherma J: Thin Layer Chromatography in Chiral Separations and Analysis, CRC Press, USA, 2007; 48–50

15. Planinšek O: Koloidni silicijev dioksid kot nosilec učinkovin. Farmacevtski vestnik 2006; 57: 155–161
16. Wall PE: Thin-Layer Chromatography A modern practical approach, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005; 35–37
17. Reich E, Schibli A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 47–48
18. Kowalska T, Sherma J: Thin Layer Chromatography in Chiral Separations and Analysis, CRC Press, USA, 2007; 44–47
19. Hahn-Deinstrop E: Applied Thin-Layer chromatography – Best Practice and Avoidance of Mistakes, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007; 21–23
20. Hahn-Deinstrop E: Applied Thin-Layer chromatography – Best Practice and Avoidance of Mistakes, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007; 69–74
21. Prošek M, Pukl M: Kvantitativna planarna kromatografija, Kemijski inštitut Boris Kidrič, Ljubljana, 1991; 43–47
22. Touchstone JC: Practice of thin layer chromatography, A Wiley-Interscience Publication, New York, 1992; 86–91
23. Poole CF, Dias NC: Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. Journal of chromatography A 2000; 892: 123–142
24. Reich E, Schibli A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 48–55
25. Sherma J, Fried B: Handbook of thin layer chromatography, Marcel Dekker Inc., New York, 2003; poglavje 2, 21–23
26. Prošek M, Pukl M: Kvantitativna planarna kromatografija, Kemijski inštitut Boris Kidrič, Ljubljana, 1991; 37–41
27. Hansen SH, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis, Wiley, United Kingdom, 2012; 169–170
28. Reich E, Schibli A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 92–97
29. www.Camag.com/en/tlc_hptlc/products/sample_application.cfm (dostopno oktober 2012)

30. Reich E, Schibl A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 97–104
31. Prošek M, Pukl M: Kvantitativna planarna kromatografija, Kemijski inštitut Boris Kidrič, Ljubljana, 1991; 72–73
32. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, CRC Press, Washington, 2008; 120–129
33. http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/chromatogram_development/automatic_chamber_adc_2.cfm (dostopno oktober 2012)
34. Prošek M, Pukl M: Kvantitativna planarna kromatografija, Kemijski inštitut Boris Kidrič, Ljubljana, 1991; 95–98
35. Fried B, Sherma J: Practical thin-layer chromatography – A Multidisciplinary Approach, CRC Press, New York, 1996; 13–15
36. Hahn-Deinstrop E: Applied Thin-Layer chromatography – Best Practice and Avoidance of Mistakes, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007; 113–116
37. Reich E, Schibl A: High-Performance Thin-Layer Chromatography for the analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart, 2006; 116–121
38. Prošek M, Vovk I: Reproducibility of densitometric and image analysing quantitative evaluation of thin-layer chromatograms. Journals of Chromatography A 1997; 779: 329–336
39. http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/evaluation_detection/tlc_scanner_4.cfm (dostopno november 2012)
40. Sherma J, Fried B: Handbook of thin layer chromatography, Marcel Dekker Inc., New York, 2003; poglavje 5, 13–15
41. Humar M, Šmid-Korbar J, Obreza A: Farmacevtski terminološki slovar, Založba ZRC, Ljubljana, 2011; 227
42. [http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=35&nf=30&s=1&officialOn=August%201,%20202012](http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=35&nf=30&s=1&officialOn=August%20201,%20202012) (dostopno november 2012)
43. Miller JN, Miller JC: Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5th Edition, Pearson Education Limited, England, 2005; 45–47
44. http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/evaluation_documentation_tlc-ms_bioluminescence/tlc-ms_interface.cfm (dostopno november 2012)