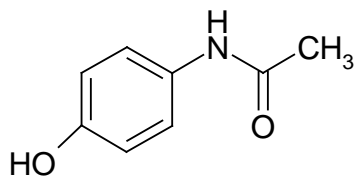
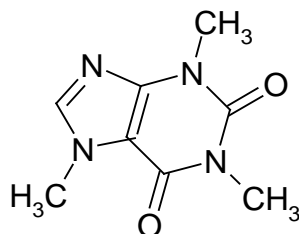
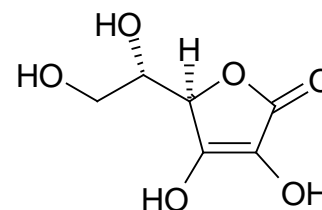


Temat ćwiczenia: Walidacja metody oznaczania paracetamolu, kofeiny i witaminy C metodą RP-HPLC.**Paracetamol**

Nazwa chemiczna: *N*-(4-hydroksyfenilo)acetamid

**Kofeina**

Nazwa chemiczna: 1,3,7-trimetylo-1*H*-puryno-2,6(3*H*,7*H*)-dion

**Witamina C**

Nazwa chemiczna: (*R*)-3,4-dihydroksy-5-((*S*)-1,2-dihydroksyetylo)furan-2(5*H*)-on

Opracowano warunki oznaczania paracetamolu, kofeiny i kwasu askorbinowego w złożonych preparatach farmaceutycznych o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym z wykorzystaniem metody RP-HPLC.

W odróżnieniu od leków przeciwbólowych z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, paracetamol wykazuje bardzo słabe działanie przeciwzapalne i nie zaburza procesu krzepnięcia krwi. Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając po 30–60 minutach maksymalne stężenie we krwi. Efekt przeciwbólowy utrzymuje się przez 3–5 godzin. Działa przez blokowanie enzymu cyklooksygenazy 2 (COX-2) w mózgu i rdzeniu kręgowym, hamując syntezę prostaglandyn. W terapii wykorzystuje się kombinację paracetamolu z kodeiną, kofeiną, kwasem acetylosalicylowym, ibuprofenem, difenhydraminą, dekstrometorfanem, fenylefryną, tramadolem czy witaminą C.

Stosowanie połączenia kofeiny z paracetamolem w terapii przeciwbólowej wzmacnia działanie paracetamolu i działa pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy. Witamina C (kwas askorbinowy) obecna w wielu preparatach złożonych paracetamolu, niezbędna w wielu przemianach metabolicznych (uczestniczy w procesach utleniania i redukcji, jest antyoksydantem, bierze m. in. udział w biosyntezie kolagenu, kwasu foliowego, hormonów kory nadnerczy, ułatwia przyswajanie żelaza), uzupełnia zwiększone zapotrzebowanie na kwas askorbinowy, występujące w czasie przeziębienia lub grypy.

Walidacja metody jest systematyczną oceną postępowania analitycznego, mającą na celu wykazanie, że jest ono naukowo prawidłowe w warunkach, w których ma być zastosowane. Walidacja metody wymaga sprawdzenia następujących parametrów analitycznych: liniowości, granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzji, precyzji pośredniej, dokładności i odporności metody (robustness).

1. Aparatura

- Chromatograf cieczowy LaChrom Elite z detektorem DAD, wyposażony w pompę tłokową, degazer, autosampler, komputerowy system rejestracji i przetwarzania danych.
- Kolumna ACE C18 100A (Aberdeen, Scotland) – o średnicy ziaren 5 μm , długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm wyposażona w prekolumnę.

2. Warunki rozdziału i detekcji:

- faza ruchoma: metanol-woda (40 : 60 v/v)
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 mL/min
- temperatura kolumny – 25°C
- ciśnienie na wlocie kolumny do 225 bar
- detekcja spektrofotometryczna przy długości fali 230 nm
- objętość próbki dozowanej na kolumnę 10 μL

3. Walidacja metody.

Liniowość

Określa zdolność uzyskiwania wartości mierzonych, które są wprost proporcjonalne do stężenia analitu w próbkach. Do badania wykorzystuje się przynajmniej 5 roztworów o różnych stężeniach obejmujących zakres od 80-120% lub od 50-150% dla substancji głównej w odniesieniu do oczekiwanych wyników analizy. Odpowiedź detektora jako funkcja stężenia wzorców powinna być liniowa.

1. Przy pomocy programu Statistica wyznaczyć równanie prostej zależności wielkości pól powierzchni pików substancji badanej od jej stężenia.

Równanie prostej: $y = ax + b$

a – współczynnik kierunkowy prostej

b - wyraz wolny

2. Oszacować istotność współczynnika kierunkowego prostej i wyrazu wolnego na podstawie wartości p .

Weryfikacja założeń modelu liniowego:

3. Normalność rozkładu reszt – test Shapiro-Wilka.

H_0 – rozkład składnika losowego jest rozkładem normalnym.

Obliczyć wartość statystyki W .

Gdy:

$W > W^*_{n,\alpha}$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o normalności rozkładu reszt,

$W < W^*_{n,\alpha}$ odrzucamy hipotezę o normalności rozkładu reszt.

Gdzie: $W^*_{n,\alpha}$ - wartość krytyczna dla n prób na poziomie istotności $\alpha=0.05$.

4. Autokorelacja składnika losowego – test Durbina-Watsona.

H_0 – nie występuje autokorelacja składnika losowego.

Obliczyć wartość statystyki DW .

Gdy $DW < 2$ należy zweryfikować istnienie dodatniej autokorelacji:

- $DW < d_L$ odrzucamy hipotezę o braku autokorelacji i przyjmujemy, że w modelu jest dodatnia autokorelacja,
- $d_L < DW < d_U$ brak konkluzji, test nie rozstrzyga,
- $DW > d_U$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o braku autokorelacji.

Gdy $DW > 2$ należy zweryfikować występowanie autokorelacji ujemnej:

- $DW > 4-d_L$ odrzucamy hipotezę o braku autokorelacji i przyjmujemy, że w modelu występuje ujemna autokorelacja,
- $4-d_U < DW < 4-d_L$ brak konkluzji, test nie rozstrzyga,
- $DW < 4-d_U$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o braku autokorelacji.

Jeżeli $DW = 2$ brak autokorelacji.

Gdzie: d_L, d_U – dolna i górna wartości krytyczne testu.

5. Jednorodność modelu (heteroskedastyczność) – test Bartleta.

H_0 – wariancja rozkładu reszt modelu jest stała.

$p > 0.05$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o jednorodności wariancji,

$p < 0.05$ odrzucamy hipotezę o jednorodności wariancji.

Granica wykrywalności i oznaczalności

Za granicę wykrywalności (*limit of detection*) LOD przyjmuje się takie stężenie (ilość) analitu, który daje wartość sygnału analitycznego ok. 2-3 razy większą od poziomu szumów. Można ją wyznaczyć ze wzoru:

$$\text{LOD} = 3,3 S_y / a$$

Za granicę oznaczalności (*limit of quantitation*) LOQ przyjmuje się takie minimalne stężenie (ilość) analitu, które daje sygnał, umożliwiającą uzyskanie precyzyjnych i dokładnych wyników. Akceptowany jest sygnał ok. 10 razy większy od poziomu szumów. Można ją wyznaczyć ze wzoru:

$$\text{LOQ} = 10 S_y / a$$

a – współczynnik kierunkowy prostej

S_y – standardowy błąd estymacji

Precyzja i precyzja pośrednia

Precyzja wyraża stopień zgodności pomiędzy poszczególnymi wynikami analiz, powtarzanymi wielokrotnie np. dla $n=6$ na jednym poziomie stężeń lub dla $n=3$ na trzech poziomach stężeń. Do porównania precyzji wykorzystuje się wartość względnego odchylenia standardowego (RSD).

Precyzja pośrednia – wyraża precyzję wyników otrzymanych w różnych dniach i wykonanych przez innego analityka.

Na podstawie wyników uzyskanych dla precyzji i precyzji pośredniej otrzymanych dla 3 poziomów stężeń obliczyć wartości %RSD.

Dokładność

Dokładność sprawdza stopień zgodności uzyskanych wyników z wartością rzeczywistą. Dokładność można przedstawić jako stopień % odzysku analitu dodanego do znanej ilości próbki lub jako różnicę pomiędzy średnią i akceptowaną wartością prawdziwą.

Z uzyskanych na chromatogramach pól powierzchni i stężenia wzorców paracetamolu, kofeiny i witaminy C obliczyć procent odzysku:

$$R = \frac{X}{Y} \cdot 100\%$$

R – procent odzysku

X – oznaczone stężenie analitu

Y – rzeczywiste stężenie analitu

Zakres metody

Obejmuje obszar pomiędzy górnym i dolnym przedziałem stężeń w którym wykazano, że oznaczenia można prowadzić z akceptowaną precyzją, dokładnością i liniowością.

Obliczone wyniki walidacji metody oraz kryteria akceptacji umieścić w sprawozdaniu. Wyciągnąć wnioski czy metoda spełnia kryteria akceptacji i nadaje się do analizy ilościowej badanych leków w preparatach farmaceutycznych.

Literatura:

1. J. Pawełczyk, M. Zając „Walidacja metod analizy chemicznej. Przykład walidacji metod” Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań 2005.
2. ICH-Q2, (R1) Validation and Analytical Procedures: Text and Methodology, International Conference on Harmonization, Geneva, November 2005, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf