

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**Vývoj HPLC metody na stanovení obsahu substance
Riluzolu v oplachovém rozpouštědle, validace metody**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor práce: Mgr. Lucie Hanková

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí rigorózní práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph. D.

Olomouc 2015

Souhrn

Analytická chemie lékových substancí (API) podléhá kontrolám národních autorit jako je např. Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) a Úřad pro kontrolu potravin a léčiv; Food and Drug Administration (FDA); vládní agentura Spojených států amerických resortu zdraví a služeb. Klíčová metoda na stanovení příbuzných látek (related substances) a obsah API je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Zabývala jsem se modifikací americké lékopisné HPLC metody na stanovení příbuzných látek a obsahu Riluzolu. Cílem této práce byl přenos původní HPLC metody na HPLC metodu umožňující stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém rozpouštědle. Cesta vývoje nové metody byla původně zamýšlena pomocí HILIC chromatografie. V systému hydrofilních interakcí nebylo dosaženo dobrých výsledků. Dalším krokem vývoje se tedy stala optimalizace původní USP metody na reverzních fázích. Modifikace lékopisné metody se zdařila, kvalita separace v nově vytvořeném systému byla potvrzena dobrými validačními parametry, které jsou kriticky zhodnoceny v závěru. Dále byla nová HPLC metoda porovnána s původní spektrofotometrickou metodou na stanovení obsahu Riluzolu v oplachových rozpouštědlech. Naměřené výsledky reálných vzorků obou metod, shodující se i v limitních koncentracích potvrdily správnost nově vyvinuté HPLC metody.

Summary

Analytical chemistry of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) is under a supervision of national authorities, for instance the Czech State Institute for Drug Control (SÚKL), and the Food and Drug Administration (FDA), a federal agency of the United States Department of Health and Human Services. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is a principal method for the determination of assay and related substances in APIs. I was working on a modification of the U.S. pharmacopoeial HPLC method for the determination of assay and related substances in the API Riluzole. A goal of this study was the modification of the original HPLC method to a new one suitable for the determination of Riluzole assay in a solvent used for the cleaning of production equipment – a washing solvent. The development of a new method was originally intended by using HILIC chromatography. There weren't achieved good results in the system of hydrophilic interactions. So the next step of the development has become the optimization of original USP method on a reverse phase. The modification of the pharmacopoeic method was successful. The quality of a separation in the newly created system was confirmed by the right validation parameters that are critically evaluated at the end of this Rigorous thesis. Moreover, the new HPLC method was compared with the original spectrophotometric method for the determination of Riluzole in the rinsing solvents. The measured results of the real samples, identical in the limit concentrations, which were obtained by using these two methods, confirm the correctness of newly developed HPLC method.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

.....

Podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph. D. za odborné vedení, pomoc a rady při vypracovávání, vyhodnocování a sepisování rigorózní práce.

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Lucie Hanková
Název práce:	Vývoj HPLC metody na stanovení obsahu substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle, validace metody
Typ práce:	Rigorózní práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	Cílem práce bylo vyvinout a následně zvalidovat HPLC metodu na stanovení lékové substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle
Klíčová slova:	HPLC, vývoj metody, lékové substance, validace
Počet stran:	61
Počet příloh:	36
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Mgr. Lucie Hanková

Title: Development of the HPLC method for determinativ assay of Riluzole in the rising solution, validation of method

Type of thesis: Rigorous thesis

Department: Department of Analytical chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph. D.

The year of presentation: 2015

Abstract: The aim of the work was to develop and subsequently validate a HPLC methods for determining of drug subsatnces Riluzole in the rising solution.

Keywords: HPLC, method development, drug substances, validation

Number of pages: 61

Number of appendices: 36

Language: Czech

OBSAH

!Neočekávaný konec výrazu

2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	12
2.1.1	Retenční charakteristiky	13
2.1.1.1	Retenční čas t_R	13
2.1.1.2	Retenční objem $V_{R,i}$	13
2.1.1.3	Lineární rychlost mobilní fáze u	14
2.1.1.4	Retenční poměr k (míra retence separovaných látek).....	14
2.1.1.5	Počet teoretických pater n	14
2.1.1.6	Výškový ekvivalent teoretického patra H (HEPT – Height Equivalent to a Theoretical Plate)	14
2.1.1.7	Redukovaná výška teoretického patra h	15
2.1.2	Rozmývání elučních zón	15
2.1.2.1	Van Deemterova rovnice	15
2.1.2.2	Zkrácený zápis van Deemterovy rovnice	17
2.1.2.3	Mimokolonové příspěvky	18
2.1.3	Asymetrie píku	19
2.1.4	Rozlišení.....	20
2.1.5	Separční faktor (selektivita) α	21
2.1.6	Statistické parametry	21
2.1.6.1	Směrodatná odchylka	21
2.1.6.2	Relativní směrodatná odchylka	21
2.1.7	Základní typy chromatografických systémů	21
2.1.7.1	Normální fáze	21
2.1.7.2	Reverzní fáze	22
2.1.7.3	HILIC (systém hydrofilních interakcí).....	23

2.1.7.4	Stacionární fáze	24
2.1.8	Isokratická a gradientová eluce v HPLC.....	26
2.1.9	Instrumentace pro HPLC.....	26
2.1.9.1	Čerpací systémy.....	26
2.1.9.2	Dávkovací zařízení	27
2.1.9.3	Kolony	27
2.1.9.4	Detektory	28
2.1.9.5	Spektrofotometrické detektory	29
2.2	Validace	31
2.2.1	Definice validace.....	31
2.2.2	Validace analytických metod	31
2.2.3	Validační program.....	31
2.2.4	Struktura validací, validační parametry	32
3	Experimentální část	39
3.1	Riluzol.....	39
3.1.1	Chemický název, strukturní vzorec, sumární vzorec, molekulová hmotnost.....	39
3.1.2	Fyzikálně chemické vlastnosti látky	40
3.2	Vývoj HPLC metody na stanovení obsahu léčivé substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle.	41
3.2.1	Přístroje:	41
3.2.2	Kolony:.....	41
3.2.3	Chemikálie:	42
3.2.4	USP metoda na stanovení čistoty substance Riluzolu.....	43
3.2.5	Spektrofotometrická metoda na stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém rozpouštědle	44
3.2.6	Parametry použitých HPLC metod	46
4	Výsledky a diskuze.....	49
4.1.1	Úvod do problematiky.....	49

4.1.2	Přehled použitých metod	49
4.2	Limity parametrů nově vyvinuté HPLC metody na stanovení obsahu substance Riluzolu.....	50
4.3	Naměřená data jednotlivých metod	51
4.4	Výsledky validace vyvinuté metody	54
4.5	Srovnání se spektrofotometrickou metodou	55
5	Závěr	56
	Seznam použité literatury.....	58

1 ÚVOD

Riluzol je léčivá látka (API) používaná na amyotrofickou laterální sklerózu (ALS). Na americký trh ho uvedla firma Sanofi- Aventis v prosinci 1995. Na území USA se prodává pod obchodním názvem Rilutek.¹ ALS, známá též jako Lou Gehrigova choroba, či nemoc motoneuronů je onemocnění mozku způsobující degeneraci a ztrátu buněk centrální nervové soustavy, které vůlí ovládají svalové pohyby. Postupně dochází ke svalové slabosti. Mozek nakonec není schopen ovládat většinu svalů a poškozený zůstává paralyzován, při zachování psychických a mentálních schopností. Etiologie onemocnění není známá.^{2,3} Rychlost postupu nemoci je individuální. Doposud nebyla na ALS nalezena žádná léčba. Dostupné léky, jako je např. Riluzol, se zaměřují především na snížení obtíží a prevenci komplikací.⁴ Některé vědecké studie objevily souvislost mezi ALS a některými zemědělskými pesticidy.^{5, 6, 7} Riluzol je registrován v bibliografické databázi Národní lékařské knihovny USA.⁸ Jeho výroba byla poprvé publikována v r. 1963.⁹ Patent firmě Sanofi- Aventis vypršel 18. června 2013. V současné době ho prodává ve Spojených státech firma Covis Pharmaceuticals, která získala práva na trhu v oblasti drog v dubnu 2013. Dne 18. června 2013 FDA schválila generické verze léků tří farmaceutických společností na území Ameriky: Apotex Corp, Glenmark Generics a Sun Pharmaceuticals.¹⁰

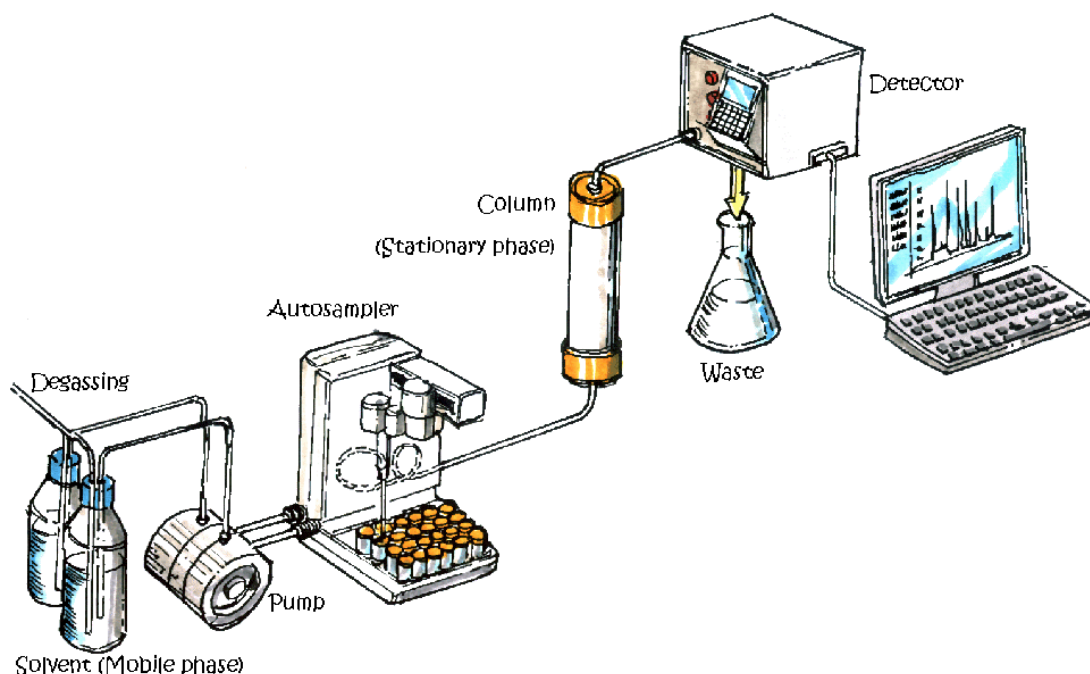
Výčet API, metody stanovení a obecná pravidla zacházení s API jsou obsahem lékopisných pramenů.^{11, 12, 13} Aktuální HPLC metoda na stanovení příbuzných látek a obsahu Riluzolu je součástí nejnovější verze amerického lékopisu z r. 2014 (USP 37; NF 32 Volume 3).¹³ Poprvé se objevil v USP lékopisu 34 z r. 2011.¹⁴

Cílem této práce byla optimalizace původní (USP) HPLC metody na stanovení nečistot a obsahu Riluzolu na HPLC metodu umožňující stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém rozpouštědle po čištění výrobního zařízení (tzn. stanovení Riluzolu v rozmezí nízkých koncentrací). Dále jsem modifikovanou HPLC metodu zvalidovala a kriticky zhodnotila v závěru.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dále jen HPLC, patří do skupiny separačních metod. Je založena na principu rozdílné distribuce látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi, z nichž první fází je kapalina tzv. mobilní fáze, dále jen MF, která prochází separačním sloupcem naplněným nosičem se zakotvenou druhou, nepohyblivou, tzv. stacionární fází. Aby byla umožněna distribuce látek mezi stacionární a mobilní fází, musí existovat fázové rozhraní, na kterém při separaci dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek. Chromatografický systém se v ideálním případě může blížit rovnováze. Distribuci složek mezi dvě fáze pak lze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D . Se zvyšující se hodnotou K_D konstanty setrvávají molekuly analytu déle ve stacionární fází. U analytů se stejnou hodnotou K_D nedochází k separaci. Distribuční konstanta bude popsána dále v textu.¹⁵ HPLC je zpravidla založena na mechanismech adsorpce, rozdělování a výměny iontů (tzv. ion-párová chromatografie).⁶ HPLC je využívána na stanovení netěkavých, nebo málo těkavých, termicky stabilních látek.¹⁶ Schéma kapalinového chromatografu obrázek 1



Obrázek 1: Schema HPLC. ¹⁷

HPLC sestava se skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a zařízení na zpracování dat. MF je do systému přiváděna přes odplyňovač tzv. degasser pomocí vysokotlakého čerpadla z jedné či více zásobních lahví. Postupuje přes tlumič pulsů a protéká většinou konstantní rychlostí kolonou a následně detektorem. Detektor je spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (PC s hardwarovou úpravou a vyhodnocovacím software). Zásobní lahve jsou naplněny rozpouštědly, která jsou používána na proplach systému a jako MF. S použitím směšovacího zařízení lze poměr rozpouštědel v průběhu analýzy programovatelně měnit tzv. gradientová eluce. Při isokratické eluci zůstává zachován stálý poměr rozpouštědel po celý čas analýzy.^{18, 19, 20}

2.1.1 Retenční charakteristiky

2.1.1.1 Retenční čas t_R

Základní, charakteristická, kvalitativní veličina pro každou separovanou látku. Jedná se o dobu od nástřiku vzorku do zaznamenání maxima eluční křivky (vrcholu píku) detektorem.

$$t_R = t_M + t'_{R,i} \text{ [min]}$$

t_M - mrtvý retenční čas → retenční čas analytu, který není zadržován na koloně (neinteraguje se stacionární fází); odpovídá době průtoku mobilní fáze od nástřiku po detektor; době pobytu analytu v mobilní fázi

t'_{R} - redukovaný retenční čas → doba pobytu analytu ve stacionární fázi

2.1.1.2 Retenční objem $V_{R,i}$

Objem MF, která proteče kolonou od nástřiku do t_R vzorku.

$$V_{R,i} = V_M + V'_{R,i} \text{ [ml]}$$

V_M - mrtvý objem → retenční objem, ve kterém nedochází k žádným interakcím analytu, pouze je unášen proudem MF (vnitřní objem kolony minus objem náplně)

V'_{R} - redukovaný retenční objem → rozdíl retenčního a mrtvého objemu

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

F_m - objemový průtok [ml/min]

2.1.1.3 Lineární rychlost mobilní fáze u

Charakterizuje průtok MF analytickou kolonou nezávisle na jejím průřezu.

$$u = \frac{L}{t_M} \text{ [cm/min]}$$

L = délka kolony

2.1.1.4 Retenční poměr k (míra retence separovaných látek)

Udává, kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi než ve fázi mobilní, tj. v kolikanásobku mrtvého času (objemu) analyt eluuje. Dále to je i poměr látkových množství analytu ve stacionární a mobilní fázi za rovnovážných podmínek.

$$k = \frac{t'_{R,i}}{t_M} = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{V_{R,i} - V_M}{V_M}$$

$$k = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_S}{V_m}$$

K_D – distribuční konstanta (poměr rovnovážné koncentrace látky ve stacionární a mobilní fázi)

2.1.1.5 Počet teoretických pater n

Počet teoretických pater je ukazatel kvality chromatografické separace. Jedná se o bezrozměrnou veličinu vyjadřující účinnost chromatografického systému (míru rozmývání elučních zón). Výpočet se provádí z šířky píku v chromatogramu.

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_b} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_{0,5}} \right)^2$$

Vysoká hodnota n → úzká eluční zóna analytu → účinná separace

2.1.1.6 Výškový ekvivalent teoretického patra H

(HEPT – Height Equivalent to a Theoretical Plate)

Vzorec udává H jako úsek kolony připadající na jedno teoretické patro. Souvisí se šířkou elučních zón analytu při průchodu kolonou. Používá se pro porovnání účinnosti kolon o různých délkách.

$$H = \frac{L}{n} [\mu\text{m}]$$

2.1.1.7 Redukovaná výška teoretického patra h

Slouží ke srovnání kolon s odlišnou velikostí částic náplně.

$$h = \frac{H}{d_p}$$

d_p – velikost částic (průměr)

2.1.2 Rozmývání elučních zón

Rozmývání elučních zón souvisí s účinností chromatografického děje. Dokonale rozseparované píky analytu s ostrými ohraničenými zónami jsou známkou kvalitní separace. Vlivem kinetických dějů ovšem dochází k rozmývání elučních zón a vzniku koncentračního profilu separované látky v eluční zóně. Míra vlivu těchto dějů má výrazný dopad na výsledný tvar chromatografického píku. Pokud molekula interaguje se stacionární fází příliš dlouho, vliv kinetických dějů se stává výraznější a tím širší jsou eluční zóny.

2.1.2.1 Van Deemterova rovnice

Původní J. J. van Deemterova rovnice určená pro plynovou chromatografii, rozšířená o další procesy probíhající v HPLC.

$$H = H_F + H_L + H_M + H_S$$

K celkovému výškovému ekvivalentu teoretického patra přispívá:

H_F – vířivá (turbulentní) difúze v mobilní fázi při průchodu náplní kolony

H_L – axiální difúze v mobilní fázi

H_S – odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi

H_M – odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi

Vířivá difúze – (angl. eddy diffusion), je způsobena nehomogenitou stacionární fáze. Molekuly MF a analytu jsou unášeny stejnou rychlostí, ale za totožný čas urazí různé dráhy (různě se předbíhají).

$$H_F = 2\lambda d_p$$

λ – geometrický faktor, koeficient nerovnoměrného plnění chromatografické kolony

Z výše uvedeného vztahu vyplývá, že se zmenšující se velikostí částic d_p klesá podíl příspěvku H_F a roste účinnost analytické kolony.

Axiální difúze – molekuly analytu difundují vlivem koncentračního gradientu z míst o vyšší koncentraci do míst o koncentraci nižší. Navíc se pohybují ve směru proudu i proti toku MF. Jelikož jsou příspěvky difúzních koeficientů v kapalinové chromatografii velmi malé, lze většinou příspěvek axiální difúze k celkovému výškovému ekvivalentu teoretického patra zanedbat. To neplatí při velmi nízkých průtocích.

$$H_L = \frac{2D_m}{u}$$

D_m – difúzní koeficient analytu v mobilní fázi

u – lineární rychlost mobilní fáze

Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi H_s

Některé molekuly analytu proniknou hlouběji do stacionární fáze než jiné.

$$H_s = \frac{d_p^2 \cdot u}{3_0 D_m} \cdot \frac{k}{(k + 1)^2}$$

Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi H_M

Tok MF (v pórech nosiče nebo mezi částicemi) se skládá z více proudů, které mají různou rychlost. Při průchodu mobilní fáze kanálkem mezi zrny nosiče mají molekuly uprostřed kanálku mnohem větší rychlost než u stěny. U povrchu nosiče (stěn) je téměř nulová, zatímco ve středu dosahuje maxima.

$$H_m = \frac{\omega \cdot d_p^2 \cdot u}{D_m}$$

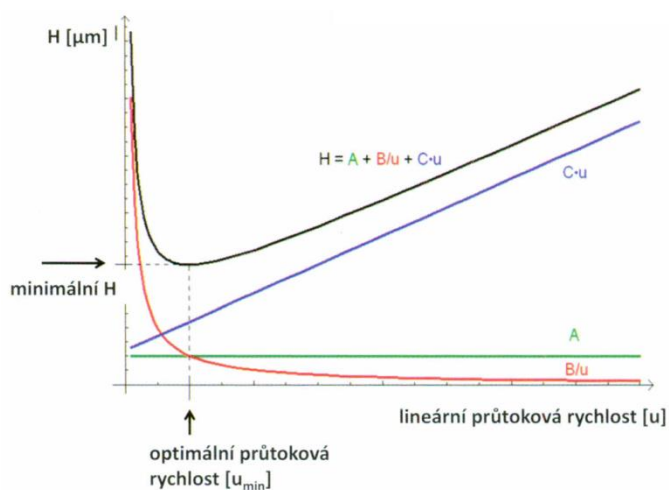
ω = faktor závislý na typu náplně

2.1.2.2 Zkrácený zápis van Deemterovy rovnice

Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti mobilní fáze. Nachází využití v praxi.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

A, B, C – konstanty pro daný chromatografický systém ²¹



Obrázek 2: Závislost výšky teoretického patra na průtokové rychlosti²²

Minimum křivky odpovídá **optimální průtokové rychlosti**. Daná kolona tehdy vykazuje **největší účinnost** a minimálně rozšiřuje zóny analytů.

Účinnost separace roste se snižující se velikostí částic náplně. Minimum křivky udává rozsah průtokových rychlostí, při kterých kolona pracuje bez velké ztráty účinnosti.

2.1.2.3 Mimokolonové příspěvky

Rozšiřují eluční zóny. K celkové šířce píku přispívá nejen kolona, ale i ostatní části HPLC systému jako nástřikové a spojovací zařízení s detektorem. Mimokolonový příspěvek je potom roven celkovému objemu těchto jednotlivých částí. Z toho vyplývá, že je žádoucí, aby byly mimokolonové příspěvky chromatografického systému co nejmenší a nesnižovaly tak účinnost analytické kolony.

$$\sigma_{celk}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{kolona}^2 + \sigma_{spoj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{el}^2$$

σ_{inj}^2 – příspěvek injektoru

Objem vzorku by měl být co nejmenší (<1. teor. patro). Eluovaná zóna by měla být pravoúhlá.

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{V_{inj}^2}{K^2}$$

K – faktor závislý na konstrukci injektoru

σ_{spoj}^2 – příspěvek spojovacích trubic

Spojovací trubice by měla mít malý vnitřní průměr a musí být co nejkratší.

$$\sigma_{spoj}^2 = \frac{\pi \cdot R^4 \cdot l \cdot F_m}{24D_m}$$

R – vnitřní poloměr

l – délka (trubice)

D_m – difúzní koeficient analytu v mobilní fázi

Při běžných rychlostech mobilní fáze vzniká v trubici **laminární proudění**, při kterém lze kapalinu považovat za soubor vrstev, mezi nimiž působí viskózní síly.

Turbulentní proudění – vzniká při velmi vysokých rychlostech, pohyb mobilní fáze je chaotický, dochází k intenzivnímu promíchávání.

σ^2_{det} – příspěvek detektoru

Závisí na objemu a geometrii detekční cely.

$$\sigma_{det}^2 \approx \frac{V_{det}^2}{K^2}$$

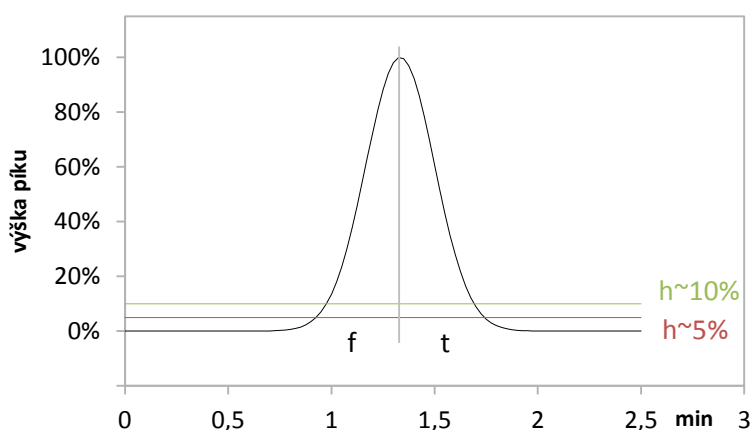
σ^2_{el} – příspěvek elektroniky

Závisí na časových konstantách elektronických obvodů (zesilovačů).

$$\sigma_{el}^2 = konst \cdot F_m^2$$

2.1.3 Asymetrie píku

Veličina popisující míru deformace profilu eluované zóny analytu a odchylku od symetrického tvaru píku. Příčiny tohoto rozmytí mohou být různé. Obvykle se uvádí přetížení analytické kolony, vedlejší rovnováha (např. adsorpce, disociace), nebo příspěvek mimokolonových objemů k rozmytí zóny.



Obrázek 3: Asymetrie píku

$$A_s = \frac{t}{f}$$

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

A_s – faktor asymetrie – určuje se v 10% výšky píku, míra souměrnosti chromatografického píku; poměr sestupné části píku (t) k vzestupné části (f)

T_f – **tailing faktor** – obdobná veličina jako faktor asymetrie, určuje se v 5 % výšky píku (w 0,05) ku dvojnásobku šířky vzestupné části (f)

$A_s; T_f = 1$ – symetrický pík (ideální Gaussovský profil)

$A_s; T_f > 1$ – píky asymetrické v sestupné části (chvostující píky)

$A_s; T_f < 1$ – píky asymetrické ve vzestupné části (frontující píky)

Vztah mezi faktorem asymetrie A_s a T_f $A_s = 2T_f - 1$ ^{21,23,24}

2.1.4 Rozlišení

Rozlišení je bezrozměrná veličina udávající schopnost chromatografického systému vzájemně oddělit dva sousední píky. Cílem HPLC separací je dosažení co nejlepšího rozdělení látek v co nejkratším čase. Nejde o dosažení co největšího rozlišení, ale o získání právě potřebného rozlišení v přijatelné době. Dokonalého rozdělení píků až na základní linii se dosáhne při rozlišení $R_{1,2} = 1,5$, kdy dochází k 0,1% překryvu dvou sousedních píků.

$$R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \cdot (W_{b,2} + W_{b,1})}$$

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot (\alpha_{1,2} - 1) \cdot \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right)$$

n – počet pater (rozlišení roste s jeho druhou odmocninou)

První člen vzorce → (kinetický) účinnost; druhý člen vzorce → (termodynamický) selektivita; třetí člen vzorce → (kapacitní) retence

Ovlivnění selektivity a retence – volbou mobilní fáze, stacionární fáze, teploty

Ovlivnění účinnosti – délkou kolony, velikostí částic, průtokem ^{21,25}

2.1.5 Separační faktor (selektivita) α

Popisuje vzájemnou retenci dvou analytů vyjádřenou poměrem jejich redukovaných časů. Separační faktor úzce souvisí s parametrem rozlišení. Blíží-li se hodnota selektivity jedné, nelze látky v daném chromatografickém systému od sebe oddělit.²¹

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

Optimalizace stacionární a MF (ovlivnění selektivity) vede ke zlepšení rozlišení výrazněji než zvýšení účinnosti počtem teoretických pater (zmenšením velikosti částic analytické kolony či prodloužením její délky).

2.1.6 Statistické parametry

2.1.6.1 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je používanou mírou statistické disperze. Popisuje se jako kvadratický průměr odchylek hodnot znaku od jejich aritmetického průměru. Teoreticky řečeno vypovídá o tom, jak moc se od sebe navzájem liší typické případy v souboru zkoumaných čísel.

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

n – počet členů, X_i – naměřená hodnota, \bar{X} – průměrná hodnota

2.1.6.2 Relativní směrodatná odchylka

Veličina udávající relativní míru přesnosti série paralelních stanovení.

$$S_r = \frac{S}{\bar{X}} \quad \text{resp.} \quad (S_r)\% = 100 \cdot S_r$$

S – směrodatná odchylka, \bar{X} – průměrná hodnota²⁶

2.1.7 Základní typy chromatografických systémů

2.1.7.1 Normální fáze

V chromatografickém systému využívajícím normální fáze (NP-HPLC) jsou pro separace analytu používány polární stacionární fáze a MF vyznačující se menší polaritou než má fáze

stacionární. Eluční mechanismus bývá v těchto případech založen na kompetici mezi separovanou látkou a MF o lokalizovaná adsorpční centra na povrchu pevné fáze, nejčastěji silikagelu modifikovaného volnými polárními skupinami např. hydroxylovými resp. silanolovými, které se účastní interakce s analytem. Obecně lze konstatovat, že je eluce dána specifickými mezimolekulárními interakcemi analytu s povrchem sorbentu a nespecifickými interakcemi analytu s MF. Následkem rozdílných polárních sil působících mezi povrchem stacionární fáze (sorbentu) a separovanou látkou a polárních sil působících mezi povrchem sorbentu a MF se analyt adsorbuje.^{12, 27, 28, 29, 30} V NP-HPLC systému zjednodušeně platí, že retenční čas roste s rostoucí polaritou analyzované látky a klesá s rostoucí polaritou MF. MF kompatibilní k NP-HPLC se připravují ze směsí organických rozpouštědel jako je např. hexan, propanol, ethanol atd. NP-HPLC systémy jsou citlivé na obsah vody v mobilní fázi, která se silně váže na hydrofilní povrch silikagelu a tím mění jeho vlastnosti, nastávají pak problémy s opakovatelností výsledků. Zároveň voda v MF zlepšuje symetrii píku snížením aktivity silikagelového povrchu. Čistý silikagel, který je sám o sobě polární, nebo silikagel s polárními (např. aminopropylovými), středně polárními (např. kyanovými, kyanopropylovými), či slabě polárními (např. nitro, diolovými) volnými, chemicky vázanými skupinami se stávají stacionárními fázemi uplatňovanými v NP-HPLC. NP nyní nalézá uplatnění především u analytů, které se v jiných systémech rozkládají.³¹ Dále se používají k separacím polárních látek a izomerů, kde rozdíly v adsorpčních energiích izomerů způsobují silnější zádrž na koloně izomerů typu *cis* nad *trans* izomery.³²

2.1.7.2 Reverzní fáze

Obecně lze říci, že RP-HPLC (neboli chromatografie na obrácených, tzv. reverzních fázích) pracuje na principu rozdělování molekul mezi mobilní a stacionární fázi. MF složené ze směsí vody, nebo pufru a jednoho či více organických rozpouštědel jako jsou např. (methanol, acetonitril, propan-2-ol, dioxan, tetrahydrofuran) se vyznačují polaritou. Stacionární fáze používané v RP-HPLC systémech se výhradně vyrábí ze silikagelu, na němž jsou navázány hydrofobní alkylové řetězce (nejčastěji oktadecylové C18, nebo oktanové C8) a jsou nepolární. Na těchto stacionárních fázích se téměř nevyskytují aktivní adsorpční centra schopná polárních interakcí. Povrch reverzní stacionární fáze interaguje pouze slabými disperzními silami, tzn. jen nespecifickými mezimolekulovými interakcemi separovaná látka-adsorbent.^{18, 33, 34, 35} Nespecifické interakce jsou mnohem slabší než polární interakce mezi polárními molekulami MF a separované látky. Tyto polární interakce dále zeslabují

nespecifické interakce molekul separovaných látek na povrchu stacionární fáze a usnadňují tak jejich návrat do objemu polárního elučního činidla.³⁶ V RP-HPLC systému lze eluci separovaných látek ovlivnit výhradně složením MF. S klesající polaritou organického rozpouštědla, či s jeho vzrůstajícím objemem v MF dochází k poklesu elučního času separované látky.³⁷ Dále lze retenční čas analytu ovlivnit např. volbou stacionární fáze (počtem uhlíků na ligandu). Obecně v RP-HPLC systémech roste eluční čas s objemem molekuly analytu (s počtem aromatických jader a objemných substituentů). Silně polární substituenty např. $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ naopak eluci separovaných látek snižují. Polární a iontové analyty totiž nejsou zadržovány (velmi slabě) na nepolárních nosičích a eluují v mrtvém objemu kolony. Tento problém lze u slabých kyselin či bází jednoduše vyřešit potlačením disociace vhodnou volbou pH.^{38, 39}

Některé typy RP stacionárních fází používaných v HPLC kolonách

C18 Si-(CH₂)₁₇-CH₃

C8 Si-(CH₂)₇-CH₃

2.1.7.3 HILIC (systém hydrofilních interakcí)

Separční hydrofilní technika vhodná pro analýzu silně polárních látek v systému vodně-organická mobilní fáze a polární stacionární fáze. Tato metoda tedy používá typ kolon (stacionárních fází) využívaných v NP systémech a vodně-organických mobilních fází, které jsou doménou RP chromatografií. Hlavním separčním mechanismem HILIC chromatografie se stávají hydrofilní proton donor-akceptorové a dipól-dipólové interakce s povrchem stacionární fáze a s kapalinou okludovanou na jeho povrchu v difúzní vrstvě. U analytů majících vlastnosti slabých kyselin či bází se mohou navíc projevit i iontově-výměnné interakce. Podstatu HILIC interakcí lze podobně definovat jako rozdělování mezi o vodu obohacenou vrstvou mobilní fáze, která je částečně okludována na povrchu stacionární fáze a o vodu ochuzenou mobilní fází proudící kolonou. Mobilní fáze bývají vytvářeny ze směsi ACN a vody, či pufru. Koncentrace ACN v těchto mobilních fázích se zpravidla pohybuje v rozmezí 50-99% .^{40, 41} K HILIC separacím se dá použít celá řada polárních kolon. Nemodifikovaný silikagel se sníženou koncentrací povrchových silanolových skupin se stal oblíbenou náplní určenou k separacím tohoto typu.⁴² Dále mohou HILIC separace využít i typu sorbentů s chemicky navázanými aminopropylovými⁴³, amidovými, nitrilovými, diolovými, polyethylenglykolovými a dalšími polárními skupinami.⁴⁴ V dnešní době byly vyvinuty náplně kolon speciálně určené pro tyto účely jako jsou např. stacionární fáze na bázi

polyimidu kyseliny jantarové,⁴⁵ či stacionární fáze s chemicky navázanými amidickými⁴⁶, zwitteriontovými, sulfobetainovými a fosforylcholinovými skupinami.⁴⁷

Při nižších koncentracích ACN v mobilní fázi se na spoustě typů polárních kolon mění chromatografické chování. Mechanismus separace látek pak odpovídá systému na reverzních fázích. V literatuře se uvádí, že eluce analyzovaných látek pomocí HILIC interakcí je obvykle obrácená oproti eluci téhož vzorku na fázi reversní, čehož se může využít při analýze vysoce polárních látek.

Významnou výhodou HILIC chromatografie je zvýšená citlivost u LC-MS analýz, zapříčiněná vyšším obsahem ACN v mobilní fázi a tím zlepšené ionizaci analytu elektrosprejem (ESI). Díky vyššímu obsahu organické složky v mobilní fázi dochází ke snížení její viskozity, tím se snižuje i pracovní tlak na koloně, což nám následně dovoluje použít větší průtok mobilní fáze kolonou a např. zrychlení separace oproti RP systému. Naopak nevýhodou HILIC chromatografie se stává poměrně pomalá ekvilibrace kolony v porovnání s RP systémem.^{48, 49, 50, 51}

2.1.7.4 Stacionární fáze

Silikagel

Lze konstatovat, že se momentálně jedná o nejrozšířenější polární anorganický sorbent, který se po chemickém navázání ligandů stává ideální stacionární fází v RP-HPLC systémech. Chemicky vázaná stacionární fáze obsahuje zbytkové silanolové skupiny (aktivní centra). Při styku pufované MF s povrchem silikagelu dochází k výměně protonu silanolových skupin za kation pufru. Teorie přisuzuje hodnotu pK_a silanolových skupin rovnou 7, prakticky ovšem –OH skupiny silikagelu disociují v širším rozmezí pH (4,5 až 7), z čehož vyplývá, že bazické látky mají na takovémto sorbentu lepší zadrž. Upřednostňují však zároveň i vyšší pH MF a se zvyšující se hodnotou pH MF roste i vliv silanolových skupin na kvalitu separace. Stoupající retenční čas a chvostování polárních, zejména tedy bazických látek, vzniká reakcí (vodíkové vazby, dipól-dipólové interakce, reakce iontově-výměnné) analytu s MF a silanolovými skupinami. Potlačení interakcí mezi bazickým analytem a silanolovými skupinami zabraňuje jeho chvostování. Používají se slabé organické báze amoniového typu (např. triethylamin, nebo silnější trioktylamin) jejich přidávkem do MF. Báze amoniového typu soutěží s analytem o aktivní centra zbytkových silanolových skupin. Tím dochází k zeslabení interakcí bazické látky se silanolovými skupinami a eliminaci chvostování. Povrch silikagelu je díky přítomnosti výše zmíněných silanolových skupin slabě kyselý. Čistá forma silikagelu

se používá při separacích v NP-HPLC uspořádání. Silikagel se pro HPLC systémy připravuje se specifickým povrchem pohybujícím se v rozmezí 5 až 500 m²/g, objemem pórů 0,7 ml/g a středním průměrem pórů vyskytujícím se v rozmezí 8 až 15 nm. Vyznačuje se vysokou chemickou a mechanickou odolností umožňující jeho použití i při vysokých tlacích. Nebobtná v přítomnosti organických rozpouštědel. Při pH= 8 a výše dochází k jeho rozpouštění.^{52, 53, 54}

Stacionární fáze s oxidy kovů

Mají lepší chemickou stabilitu než silikagel. Jejich další předností se stává možnost analýz v celém rozsahu pH a to do teplot až okolo 200 °C. Mezi zástupce těchto typů stacionárních fází patří Al₂O₃, TiO₂ a nejprostudovanější ZrO₂, který je zároveň i nejpoužívanější.⁵⁵ Níže v textu jsou popsány ZrO₂ a Al₂O₃.

Oxid zirkoničitý

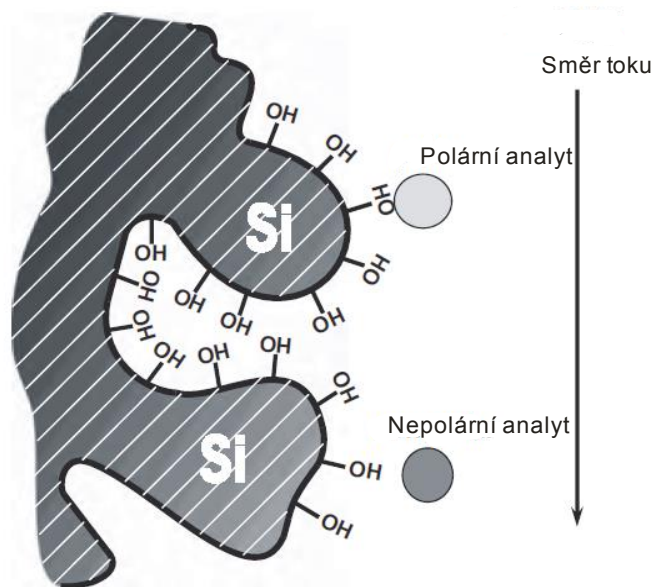
Jedná se o amfoterní měnič K⁺ a A⁻. Díky vyššímu izoelektrickému bodu interaguje s bazickými látkami méně než silikagel.⁵⁶

Oxid hlinitý (alumina)

Stacionární fáze mající podobné vlastnosti silikagelu. Povrch Al₂O₃ vytvářejí kromě hydroxylových skupin i centra s **elektron-akceptorovými** vlastnostmi schopnými interakce s analyty bohatými na elektrony (Lewisovy báze). Znamená to, že při separaci jsou uplatňovány i iontově, či ligandově výměnné reakce. Zapříčiňují odlišnou selektivitu Al₂O₃ a silikagelu při separaci látek s odlišným elektronovým rozložením. Al₂O₃ se používá výhradně u separací nenasycených, nasycených, polyaromatických uhlovodíků, či polykondenzovaných aromátů s pí elektronovým systémem. Pro separace mechanismem adsorpční chromatografie je nejvhodnější typ neutrální aluminy. Kyselý a zásaditý Al₂O₃ vykazuje vlastnosti iontoměniče.^{57, 58}

Polymerní stacionární fáze

Stabilní v celém rozsahu pH i při vyšších teplotách.⁵⁹ Práce se stacionárními fázemi typu polymeru vyžaduje max. pracovní tlak na koloně do 20MPa. Jedná se o porézní sorbenty se strukturou mikropórů o velikosti asi 1nm. To se projevuje hlavně u malých molekul a stává se tak nevýhodou nosičů tohoto typu. V RP-HPLC je nejčastěji používán kopolymer styrenu a divinylbenzenu, či polyvinyl alkoholu a metakrylátu.



Obrázek 4: Schéma interakce mezi polární stacionární fází (silikagelem) a polárním a nepolárním analytem.⁶⁰

2.1.8 Isokratická a gradientová eluce v HPLC

Isokratická eluce analytu je charakteristická stejnou eluční silou (tzn. neměnným složením) MF v průběhu analýzy. Opakem isokratické eluce se stává eluce gradientová, která je typická postupným nárůstem eluční síly MF. Vlivem proměnlivého složení MF ve prospěch silnější eluční složky v čase nedochází při gradientové eluci k rozšiřování (rozmyvání píků) s vyšším t_R , jako při eluci isokratické. Gradientová eluce vyžaduje náročnější vývoj metody a delší dobu analýzy vyplývající z nutnosti ekvibrace kolon.^{61, 62}

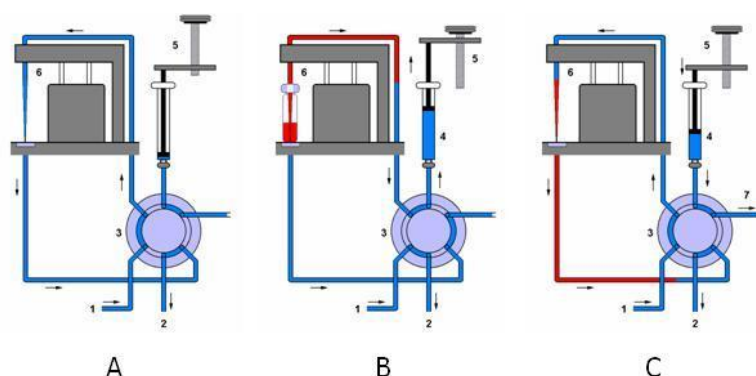
2.1.9 Instrumentace pro HPLC

2.1.9.1 Čerpací systémy

Nejčastěji používaná čerpadla v HPLC jsou čerpadla pístová. U malých průtoků MF je vhodné použít pístové čerpadlo s bezpulsním chodem. Bezpulsní chod snižuje šum chromatografického systému a je zajišťován např. použitím dvou a více pulsujících pístových čerpadel současně, jejichž činnost je fázově posunuta, nebo zařazení tlumiče pulsů do sestavy. V HPLC se pracuje s tlaky 1-60MPa při průtoku MF v rozsahu od 0,1 do 10 ml. min⁻¹.⁶³

2.1.9.2 Dávkovací zařízení

Účinnost chromatografického děje a opakovatelnost separace je závislá na dokonalém nadávkování vzorku. V současné době, kdy jsou kladeny vysoké požadavky na správné nadávkování vzorku, obzvláště v laboratořích zpracovávajících větší množství vzorků se stávají nejvíce používané vysokotlaké automatické dávkovače tzv. autosamplery umožňující nadávkování vzorku až do tlaku 80 MPa. Kapalný vzorek je nadávkován do tzv. vialky (skleněná či plastová nádobka o objemu nejčastěji 2 ml), poté se uzavře víkem se septem, umístí do prostoru dávkovacího zařízení a následně je nastříknut pomocí jehly (injekční stříkačky) do proudu MF.



Obrázek 5: Schéma automatického dávkovače firmy Agilent

A – separace; B – plnění jehly; C – dávkování vzorku,

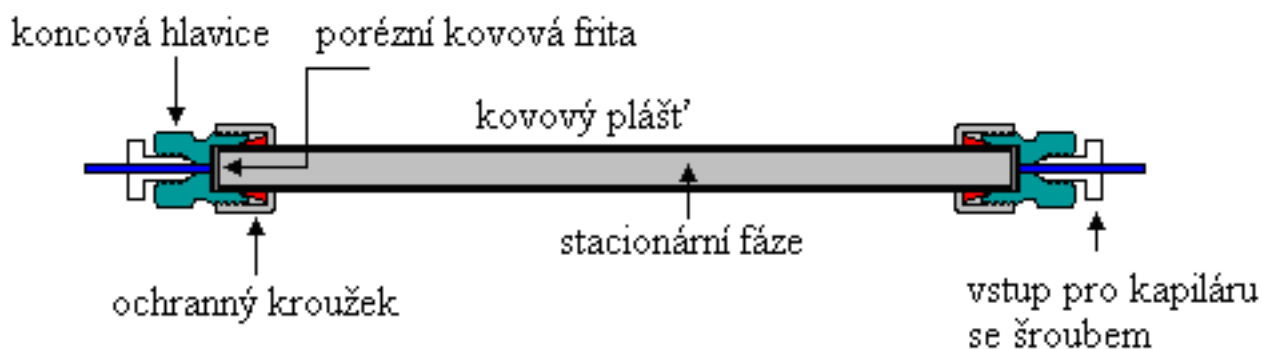
1 – vysokotlaké čerpadlo přivádějící MF do systému; 2 – kolona; 3 – šesticestný ventil; 4 – píst injekční stříkačky; 5- krokový motor; 6 – dávkovací jednotka; 7 – odpad

A – MF je vedena čerpadlem (1) přes šesticestný ventil (3) a dávkovací jednotku na kolonu
B – přepnutím ventilu, dochází k naplnění jehly (smyčky) vzorkem na softwarově zadaný objem pomocí krokového motoru (5) ovládajícího píst injekční stříkačky (4)
C – následným přepnutím ventilu je vzorek vytlačen proudem MF na kolonu (2); dávkovací systém se dostává do bodu A, dochází k vyprázdnění injekční stříkačky dávkovače do odpadu (7) ⁶⁴

2.1.9.3 Kolony

V současné době jsou dostupné v mnoha variantách (rozměry, náplně), aby vyhovovaly různým aplikacím HPLC. Vyrábějí se z vysoce antikorozivní oceli, či polymerů typu

polyetheretherketonu (PEEK), nebo zřídka kdy při tlaku do 20MPa z tvrzeného skla. Skleněné kolony bývají uloženy v kovovém plášti a jsou vysoce chemicky odolné. Vnitřní povrch kolony by měl být dokonale hladký. Stacionární fáze „náplně“ musí odolávat vysokým tlakům a chemickému působení mobilní fáze. Nejběžnější velikosti částic stacionárních fází se pohybují v rozmezí 1,0 μm až 5 μm . Obvyklý vnitřní průměr kolon měří 2,1 mm – 5,0 mm a standardní délka kolony nepřesahuje 30 cm. Pro separaci API se používají kolony vyrobené z nerezové oceli, pokud není v příslušném článku jednotlivé lékové substance uvedeno jinak. Rychlost průtoku MF kolonou u separace API pomocí HPLC se pohybuje v rozmezí (0,8 ml/min – 2 ml/min). Analytické kolony jsou tvořeny z vlastního těla a dvou koncovek. Koncovky zajišťují těsnost chromatografického systému, měly by stejnoměrně distribuovat MF unášející analyt po celém průřezu analytického lože a zadržovat náplň. Ke spojení kolony s chromatografickým systémem se používají PEEK, nebo kovové kapiláry ukončené ferulí (šroubovací spojkou).^{22, 65}



Obrázek 6: Typ kolony využívané v HPLC ²²

2.1.9.4 Detektory

Detektory zaznamenávají změny signálu mezi průtokem čisté MF a MF unášející analyt měřením chemických či fyzikálních veličin. Podle techniky detekce můžeme detektory roztrdit na spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, vodivostní, refraktometrické a hmotnostní. Analýzy léčivých látek standardně monitorují spektrofotometrické UV/VIS a DAD detektory (UV/VIS detektory diodového pole). Dále je možné použít spojení (LC) s MS (mass spektrometry) detekcí. ¹⁸ UV/VIS detektory patří mezi nedestruktivní detektory tzn. nedochází k chemické změně detekovaného analytu. Jestliže u detekce analyzované látky dochází k její nevratné změně, označujeme detektor jako destruktivní např. (MS). Detektory se dále dělí na koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory měří změny koncentrace

složky v eluentu nezávisle na rychlosti průtoku MF (UV/VIS). Hmotnostní detektory měří změny hmotnostního toku složky v eluentu. Při změně rychlosti průtoku MF zůstává plocha píku stejná, mění se jeho výška. Detektory můžeme také třídit podle možností jejich využití na detektory univerzální, selektivní a specifické.⁶⁶

2.1.9.5 Spektrofotometrické detektory

UV/ VIS detektory

Jsou založeny na principu měření absorpce záření v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. Velikost odezvy (kvantitativní vyhodnocení) popisuje Lambert-Beerův zákon, který udává vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a velikostí absorpce vyjádřenou absorbancí (A). Citlivost těchto detektorů závisí na délce optické dráhy. Reálně vznikají odchylky od Lambert-Beerova zákona, jeho platnost je omezena. Nezahrnuje v sobě totiž vliv rozpouštědla, teploty a vlnové délky na hodnotu absorbance.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ε = molární absorpční koeficient [l/mol/cm]

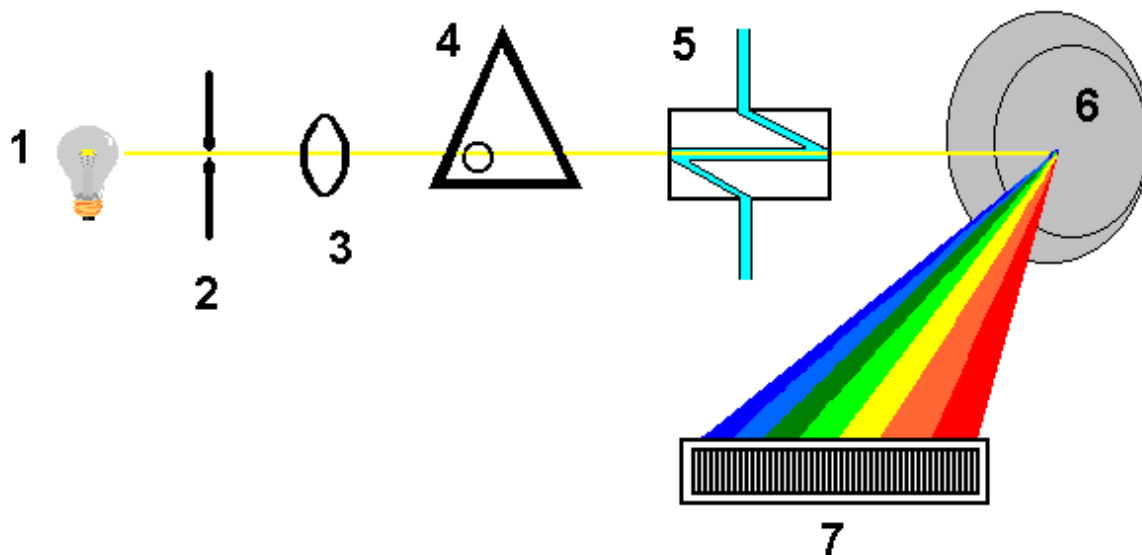
Podle konstrukce UV/VIS detektorů se dělí na:

Detektory s fixní vlnovou délkou (často 253,7 nm), měnitelnou vlnovou délkou, programovatelnou vlnovou délkou a DAD (PDA) detektory

DAD (PDA) detektory

Snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení separace. Záření prochází ze zdroje (1) štěrbinou (2), dále postupuje čočkou (3), clonou (4) a celou detektoru (5). Záření se rozkládá na holografické mřížce (6), která je součástí detektoru a zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru dopadá na systém fotodiod (7). Každá fotodiody je napojena na kondenzátor nabitý na danou hodnotu. Fotoelektrický proud vzniklý dopadem záření na fotodiody vybíjí kondenzátory. Vybití jednotlivých kondenzátorů je úměrné dopadajícímu záření na diody a vzniku fotoelektrického proudu. Při opětovném nabití kondenzátorů se měří proud potřebný na jejich dobití na původní hodnotu a zaznamenává se do paměti řídicí jednotky. Proces vybíjení a nabíjení kondenzátorů se velice rychle opakuje.

Tím se zaznamenávají údaje o absorbanci u každé vlnové délky v daném okamžiku. Používá se 512 – 1024 diod. Počet diod ovlivňuje spektrální rozlišení.



Obrázek č.7: DAD detektor ¹⁵

2.2 Validace

2.2.1 Definice validace

Validace – dokumentovaný postup poskytující vysoký stupeň jistoty, že určitý proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci. Dále validaci můžeme definovat jako např. proces, při kterém se určuje vhodnost použití daného systému pro získání relevantních dat. Kritický je výběr validačních parametrů, které se tak stávají základním kritériem pro získání dostatku údajů, aby bylo možno posoudit, zda metoda či systém jsou vhodné pro zamýšlený účel.

2.2.2 Validace analytických metod

Analytické metody mají být validovány, pokud není příslušná metoda obsažena v lékopise či jiném uznávaném standardním prameni. Vhodnost všech používaných zkušebních metod má být nicméně ověřena v rámci skutečných podmínek použití a má být zdokumentována. Stejně tak mají být vedeny úplné záznamy o veškerých modifikacích při transferu validovaných analytických metod. Tento typ záznamů (dokumentace) má obsahovat důvod modifikace s příslušnými údaji sloužícími k ověření toho, že tato modifikace má stejně přesné a spolehlivé výsledky jako zavedená metoda.⁶⁷

2.2.3 Validační program

Validační program slouží ke statistickému prokázání spolehlivosti analytické metody včetně celého obslužného analytického systému (proces určení vhodnosti měření a získávání dat v celém analytickém systému), kdy proces získávání a zpracování experimentálních dat má významný vliv na konečný analytický výsledek. Tento program stanovuje základní pravidla pro plánování a organizaci validace analytických dat a stanovuje pravidla pro uvádění a užití takto stanovených ukazatelů v praxi. Validaci můžeme definovat jako proceduru, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií. Parametr, který je předmětem validace, se nazývá validovaná vlastnost (např. koncentrace hlavní látky, koncentrace nečistoty).

2.2.4 Struktura validací, validační parametry

Validace analytických metod je založena na přezkoušení určených validačních parametrů. Parametry pro validaci vymezených analytických metod určujících obsah a čistotu léčivých látek jsou uvedeny v tab. č.1:

Tab. č. 1 Parametry validace

Přesnost	Precision
Správnost	Accuracy
Linearita	Linearity
Rozsah	Range
Limit detekce	Limit of Detection
Limit kvantifikace	Limit of Quantitation
Specifičnost	Specificity
Robustnost	Robustness

Specifičnost („specificity“) - má pro různé testovací metody odlišný význam.

1. identifikace – představuje prokázání identity analyzované látky.
2. stanovení nečistot – prokazuje, že testovací metoda umožňuje odhad obsahu nečistot.
3. stanovení obsahu – představuje prokázání, že měřený signál přísluší analyzované látce a neinterferuje s ostatními komponentami analyzovaného vzorku.

Selektivita („selectivity“) – schopnost analytické metody měřit jednoznačně analyzovanou látku v přítomnosti předpokládaných komponent analyzovaného vzorku.

Správnost („accuracy“) – představuje míru shody naměřených dat vůči hodnotám teoretickým (ustanoveným). Správnost by měla pokrývat celý rozsah metody. Správnost

analytické metody indikuje systematickou chybu a posuzuje se např. porovnáním výsledků s výsledky jiné nezávislé validované metody (např. lékopisné).

Metody stanovení správnosti:

- a) aplikace analytického postupu na analyt známé čistoty (např. referenční standard)
- b) srovnání výsledku navrhovaného analytického postupu s výsledky druhé, dobře charakterizované analýzy, jejíž správnost je potvrzena a definována
- c) správnost může být stanovena souběžně při sběru dat přesnosti, linearitu a specifčnosti

Správnost se vyjadřuje jako rozdíl hodnot nebo jako návratnost (Recovery).

$$\frac{\textit{nalezená hodnota} \times 100}{\textit{skutečná hodnota}}$$

Na stanovení správnosti se používá minimálně 9 vzorků, minimálně ve třech koncentračních hladinách pokrývajících celý specifický rozsah (např. 3 koncentrace, 3 opakování každé z nich).

V případě kvantifikace nečistot je správnost hodnocena na vzorcích se známým množstvím nečistot. V případě, kdy není možné získat vzorky určitých nečistot, anebo degradačních produktů, je přijatelné porovnání výsledků s výsledky získanými jiným nezávislým způsobem. Při hodnocení správnosti analytické metody pro stanovení nečistot lze do výpočtu zahrnout odezvové faktory jednotlivých nečistot.

Přesnost („precision“) – udává míru shody mezi jednotlivými výsledky získanými za předepsaných podmínek na homogenním vzorku. Přesnost indikuje náhodné chyby a vyjadřuje se pomocí variability výsledků (respektive směrodatnou odchylkou S.D.; relativní směrodatnou odchylkou R.S.D.).

Opakovatelnost („Repeatability“)

Vyhodnocení se provádí za podmínek:

- a) minimálně 9 stanovení pokrývajících specifický rozsah
(např. 3 koncentrace/3 opakování každé z nich)
- b) minimálně 6 stanovení při 100 % koncentraci látky

Přesnost analytické metody uvnitř laboratoře (Intermediate Precision)

Studuje se, jaký vliv na přesnost metody má: jiný operátor, jiný přístroj, rozdílnost šarží reagensů, opakování analýzy v jiný den atp.

Není nezbytné studovat tyto efekty individuálně, ale jsou možné jejich kombinace.

Reprodukovatelnost („Reproducibility“)

Je stanovena na základě mezilaboratorních pokusů. Reprodukovatelnost je nutno brát v úvahu pouze v případě standardizace analytických metod např. mají-li být převzaty do lékopisu.

Detekční limit („limit of detection“) – tato charakteristika je nutná především pro limitní testy. Limit detekce je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, která může být nalezena zkoumanou metodou (avšak není již spolehlivě kvantifikovatelná).

Ke stanovení limitu detekce je možné použít různé přístupy v závislosti na tom, zda jde o postup neinstrumentální nebo instrumentální.

Přístup založený na vizuálním hodnocení

Vizuální hodnocení může být použito pro neinstrumentální i instrumentální metody.

Detekční limit je určen analýzou vzorku se známými koncentracemi analytu stanovením minimální úrovně, při které může být analyt spolehlivě detekován.

Přístupy založené na poměru signál/šum

Tento způsob může být aplikován pouze u analytických postupů vyznačujících se šumem základní linie. Stanovení poměru signál/šum provádí porovnání signálu vzorku o známé nízké koncentraci analytu se slepými vzorky a stanovením min. koncentrace, při které analyt může být spolehlivě detekován. Obecně je přijatelný poměr signál:šum 3:1.

Postup založený na standardní odchylce odezvy a směrnici.

Limit detekce (LD) může být vyjádřen jako:

$$LD = \frac{3 \cdot \sigma}{S}$$

σ standardní odchylka odezvy

S směrnice kalibrační křivky

Směrnice S může být stanovena z kalibrační křivky analytu.

Výpočet σ může být proveden různými způsoby např.: způsob založený na zjištění standardní odchylky slepého pokusu nebo vyšetření průběhu kalibrační křivky v oblasti detekčního limitu (σ úseku na ose Y).

Detekční limit je udáván jako koncentrace (% , ppm, atd.) látky v určité substanci.

Kvantifikační limit („limit of quantification“) – představuje nejmenší množství (koncentraci) látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností (správností) za předepsaných podmínek. Opět existují různé přístupy na stanovení limitu kvantifikace v závislosti na tom, zda se jedná o analytické postupy neinstrumentální nebo instrumentální.

Postupy založené na vizuálním vyhodnocení

Vizuální vyhodnocení může být použito pro instrumentální nebo neinstrumentální metody.

Kvantitativní limit je obecně určen analýzou vzorku o známé koncentraci analytu a stanovením min. úrovně, při které může být analyt kvantifikován s přijatelnou správností a přesností.

Postupy založené na poměru signál/šum

Tento způsob může být aplikován pouze u analytických postupů vyznačujících se šumem základní linie. Stanovení poměru signál/šum se provádí porovnáním signálu vzorku o známé nízké koncentraci analytu se slepými vzorky a stanovením min. koncentrace, při které může být analyt ještě spolehlivě kvantifikován. Typický poměr signál/šum je 10:1.

Postupy založené na standardní odchylce odezvy a směrnici

Limit kvantifikace (LQ) může být vyjádřen jako:

$$LD = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$$

σ standardní odchylka odezvy

S směrnice kalibrační křivky

Směrnice S může být stanovena z kalibrační křivky analytu.

σ může být vypočtena řadou způsobů např. zjištěním standardní odchylky odezvy opakovaných slepých pokusů nebo vyšetřováním průběhu regresní přímky v oblasti limitu kvantifikace (σ úseku na ose Y). Limit by měl být následně validován analýzou přiměřeného

počtu vzorků, o nichž je známo, že jsou blízko limitu kvantifikace nebo byly takto připraveny.

Linearita („linearity“) – Linearita je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Může být přímo prokázána za použití substance (ředěním standardního zásobního roztoku), anebo za použití uměle připravovaných směsí složek produktu a za použití zamýšleného postupu. Linearita analytické metody se doloží buď graficky jako závislost výsledků (procenta, měřená veličina, obsah) na koncentraci stanovené látky nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Uvádí se korelační koeficient, směrnice, y-úsek, „součet čtverců“.

Pro hodnocení linearity je potřeba minimálně pěti různých koncentrací standardní látky v rozsahu 50 – 150% předpokládané pracovní koncentrace.

Rozsah („range“) – interval mezi spodní a horní koncentrací analyzované látky ve vzorku, pro kterou bylo demonstrováno, že analytická metoda má odpovídající přesnost, správnost a linearitu. Pro stanovení obsahu substance je doporučený rozsah 80 % – 120 %, u známých nečistot je doporučen rozsah od limitu oznámení (0,05%) do 120% koncentrace uvedené ve specifikaci. Pokud je obsah i čistota stanovena v jednom testu a pouze za použití standardu hlavní látky, pak linearita u nečistot musí pokrýt rozsah od limitu oznámení (0,05%) do 120 % koncentrace uvedené ve specifikaci.

Citlivost („sensitivity“) – vyjadřuje schopnost metody zaznamenat malé rozdíly v koncentraci.

System suitability („system suitability test“)

Z 5-ti nástřiků standardu se vyhodnotí instrumentální přesnost a statisticky zpracuje (S.D., RSD.). Rozlišení a vlastnosti píků se vyhodnocují v rámci Specifičnosti.

Robustnost („ruggedness“ „robustness“)

Definice: Robustnost analytického postupu je míra způsobilosti zůstat netečný vůči malým, ale záměrným změnám parametrů metody. Poskytuje informaci o jeho spolehlivosti během běžného používání. Změna podmínek může nastat u případů mezilaboratorních zkoušek (jiná laboratoř, analytik, instrument = RUGGEDNESS), nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (teplota, koncentrace, doba extrakce = ROBUSTNESS).

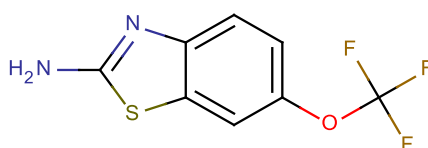
Největší problém při ověřování robustnosti podle výše uvedené definice je definování míry (velikosti) odchylky (parametru), resp. mírného kolísání úrovně. Nebyla stanovena žádná kritéria (velikost odchylky), ale obecně by se mělo vycházet z nejistoty měření nebo předpisů (PhEur, USP).

Výsledkem není závěr, že metoda je robustní nebo nerobustní, ale výsledkem robustnosti je informace, jaké parametry metody jsou kritické, vyžadující pečlivou kontrolu. Výsledkem testování může být také interval kritických parametrů metody, ve kterém metoda poskytuje nejmenší chyby měření. ^{68, 69, 70, 71, 72, 73}

3 Experimentální část

3.1 Riluzol

3.1.1 Chemický název, strukturní vzorec, sumární vzorec, molekulová hmotnost



Strukturní vzorec:

Chemický název: 6-(Triflouromethoxy)benzothiazole-2-amine **CAS No. : 1744-22-5**

Sumární vzorec: C₈H₅F₃N₂OS

Molekulová hmotnost: 234,20 g.mol⁻¹

3.1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti látky

Vzhled: Bílý až nažloutlý krystalický prášek

Rozpustnost: United States Pharmacopeia (USP) specifikace udává rozpustnost Riluzolu ve směsi ACN:H₂O v poměru 45:55.

Zařízení používaná na výrobu léčivých látek bývají po dokončení výrobní kampaně následně oplachována. Důvodem je odstranění zbytků léčivé látky z aparatury před výrobou léčivé látky jiného charakteru. Nejčastějším a nejlevnějším oplachovým rozpouštědlem je voda. Dále se používá např. MeOH, či ethanol. Důležitými kritérii při výběru oplachového rozpouštědla se stávají jednak rozpustnost dané látky v rozpouštědle a cenová dostupnost rozpouštědla. Pro další vývoj metody byla rozpustnost Riluzolu sledována hlavně ve vodě a MeOH.

Rozpustnost byla postupně testována na navážkách 2mg do 10 ml odměrné baňky viz. tab. č. 2

Tab. č. 2 Rozpustnost Riluzolu

Rozpouštědlo	Poměr rozpouštědel	Riluzol
H ₂ O	-	Částečně
MeOH	-	ANO
ACN	-	ANO
ACN/H ₂ O	(45/55)	ANO (USP)

3.2 Vývoj HPLC metody na stanovení obsahu léčivé substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle.

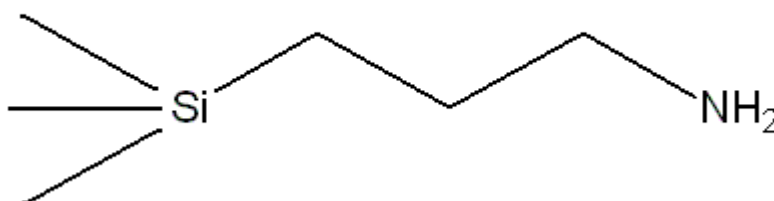
3.2.1 Přístroje:

Sestava kapalinového chromatografu Agilent 1100 s vysokotlakým kvartérním čerpadlem a UV/VIS detektorem, integrátor Chemstation.

3.2.2 Kolony:

Při výběru kolon bylo přihlédnuto k jejich dostupnosti. Strukturální vzorec Riluzolu obsahuje mírně polární $-NH_2$ a $O-CF_3$ skupiny. Vzhledem ke zjištěné částečné polaritě Riluzolu určené ze strukturálního vzorce jsem se rozhodla pro vývoj metody na běžně používaných reverzních fázích za pomoci nepolárních C18, nebo mírně polárních kolon typu C8, které zadržují látky tohoto typu a jsou základem analytiky na reverzních fázích. Jako další možná varianta se vzhledem k již zmíněné polaritě stanovované láky v systému s MF používanou v USP specifikaci, při stanovení čistoty, resp. nečistot, nabízela HILIC chromatografie. K dispozici jsem měla propylaminovou kolonu.

1. LiChrospher 100 (NH_2) 5.0 μm HPLC Column 250 mm \cdot 4.0 mm



Kolona vykazující polární a hydrofobní vlastnosti. Používá se u separací látek pomocí iontové chromatografie, dále nachází využití v HPLC systémech na normálních a reverzních fázích. Mezi typické aplikace této kolony patří separace sacharidů pomocí chromatografie s reverzní fází, nebo separace nukleotidů metodou iontové chromatografie.

2. LiChrospher 100 RP-select B 5.0 µm HPLC Column 250 mm · 4.0 mm



Univerzální kolona vyrobená ze sférického sorbentu na bázi silikagelu, vykazující vlastnosti reverzní fáze. Je zvláště vhodná na separaci bazických látek, ale také nabízí dobré vlastnosti na stanovení neutrálních a kyselých sloučenin. Náplň těchto kolon vytváří silikagel s oktylderiváty. Odolnost těchto kolon se uvádí v rozmezí pH 2 – 7,5.

3.2.3 Chemikálie:

Reagencie:

H₂O, LiChrosolv, Merck, 1.15333
ACN g.g., LiChrosolv, Merck, 1.00030
MeOH g.g., LiChrosolv, Merck, 1.06007

Substance:

Riluzol pracovní standard 26011111-S
(navázaný na USP standard Riluzolu F0I206)

3.2.4 USP metoda na stanovení čistoty substance Riluzolu

USP metoda na stanovení čistoty (resp.nečistot) lékové substance Riluzolu deklaruje správné výsledky pouze na stanovení nečistot. V tomto systému se pracuje s velkým objemem nastříknutého vzorku a pro majoritní komponentu vzorku dochází k překročení kapacity kolony. Metoda není určena na stanovení obsahu Riluzolu v nízkých koncentracích (řádově mg/ml).

Mobilní fáze: ACN/H₂O (45/55)

Kolona: ZORBAX Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 4,6 · 150mm

Rozpouštědlo: MF

Průtok: 2ml/min

Nástřík: 100 μ L

Detekce: 221nm

Délka analýzy: 35min

Roztok vzorku: 25mg zkoumané substance v 50ml rozpouštědla

Zásobní roztok standardu: 25mg standardní látky Riluzolu v 50ml rozpouštědla

Roztok standardu: 1ml zásobního roztoku standardu zředěný rozpouštědlem do 100ml odměrné baňky. 1ml tohoto roztoku se nadále ředí rozpouštědlem do 10ml odměrné baňky. Výsledná koncentrace 0,5 mg/L (0,1% roztok).

Roztok nečistot: 2,5mg standardu 4-TFMA (nečistoty A) + 2,5mg standardu Br-derivátu (nečistoty B) do 10ml rozpouštědla. 1ml tohoto roztoku se nadále ředí rozpouštědlem do 10ml odměrné baňky.

Roztok SST: 0,5ml roztoku nečistot napipetováno do 25ml odměrné baňky a doplněno zásobním roztokem standardu po rysku.

<u>Látka</u>	<u>RF</u>	<u>CF</u>	<u>Sekvence</u>
Riluzol	1	1	1. 1 · slepý vzorek (MF)
Nečistota A	0,16	6,25	2. 5 · roztoku standardu
Nečistota B	0,54	1,85	3. 1 · SST
Nečistota C (Dibromo TFMA)	0,28	3,57	4. 2 · vzorek z 1. navážky

TFMA = 4-Trifluoromethoxyanilin

Vyhodnocení – podmínky platnosti metody:

Rozlišení mezi Riluzolem a nečistotou A v roztoku SST musí být $\geq 1,5$. Tailing faktor Riluzolu standardního vzorku musí být $\leq 2,0$. RSD z opakovaných nástřiků standardního vzorku musí být $\leq 2,0\%$.

3.2.5 Spektrofotometrická metoda na stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém rozpouštědle

Obecně – Stanovení obsahu Riluzolu měřením absorbance na spektrofotometru

Použité chemikálie:

Reagencie:

Substance:

MeOH g.g., LiChrosolv, Merck, 1.06007

Riluzol pracovní standard 26011111-S

Podmínky měření:

(navázaný na USP standard Riluzolu F0I206)

Přístroj: UV spektrofotometr Shimadzu UV-1601

Kyveta: 1.0 cm pro měření v UV oblasti

Vlnová délka: 223 nm

Rychlost skenování: Střední

Interval vzorkování: 0.1 nm

Roztok standardu:

Bylo naváženo přibližně přesně 10,00 mg standardu Riluzolu do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěno v MeOH a doplněno MeOH po rysku. Následně bylo z tohoto roztoku odpipetováno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno MeOH po rysku.

Pracovní postup:

1. nastavení nulové linie měřením MeOH proti MeOH
2. měření standardního roztoku proti MeOH (kalibrace)
3. nastavení nulové linie měřením oplachového rozpouštědla proti oplachovému rozpouštědlu
4. měření vzorku proti oplachovému rozpouštědlu (2 krát) maximálně 5 vzorků

(pro měření více vzorků bylo třeba systém zrekalibrovat – kalibrace je vyhovující, pokud se naměřená absorbance standardu vyskytuje v rozmezí 0.72 – 0.82)

Výpočet:

Byl prováděn programem UV PC, nalezené hodnoty byly uvedeny v reportu. Do kalibrační tabulky byly dosazeny následující hodnoty:

Obsah standardu Riluzolu (mg/L) = C_k

$$C_k = \frac{m_{st}}{2}$$

m_{st} - navážka Riluzolu v roztoku standardu (mg)

Obsah Riluzolu ve vzorku (oplachovém rozpouštědle) bylo vypočítáno ze vzorce uvedeného níže.

$$\text{Obsah Riluzolu} = C_k \frac{A_{vz}}{A_k}$$

C_k koncentrace Riluzolu v roztoku standardu (mg/L)

A_{vz} naměřená absorbance vzorku

A_k naměřená absorbance v kalibračním roztoku

3.2.6 Parametry použitých HPLC metod

HILIC

Tab. č. 3 Metoda RP001

MF: ACN/H₂O	(45/55)
Kolona:	Propylaminová 250 · 4mm, 5 µm
Detekce:	221nm
Průtok MF:	2ml/min
Teplota kolony:	25°C
Nástřik:	20µl
Rozpouštědlo:	H ₂ O, MeOH, EtOH (jednotlivě)
Koncentrace vzorku:	5 mg/50ml z tohoto roztoku 5ml/50ml →10mg/L

Tab. č. 4 Metoda RP002

MF: ACN/H₂O	(45/55)
Kolona:	Propylaminová 250 · 4mm, 5 µm
Detekce:	221nm
Průtok MF:	1,5ml/min
Teplota kolony:	25°C
Nástřik:	20µl
Rozpouštědlo:	H ₂ O, MeOH, EtOH (jednotlivě)
Koncentrace vzorku:	5mg/50ml z tohoto roztoku 5ml/50ml →10mg/L

Tab. č. 5 Metoda RP003

MF: ACN/H₂O	(55/45)
Kolona:	Propylaminová 250 · 4mm, 5 µm
Detekce:	221nm
Průtok MF:	2ml/min
Teplota kolony:	25°C
Nástřík:	20µl
Rozpouštědlo:	H ₂ O, MeOH, EtOH (jednotlivě)
Koncentrace vzorku:	5mg/50ml z tohoto roztoku 5ml/50ml →10mg/L

Tab. č. 6 Metoda RP004

MF: MeOH/H₂O	(45/55)
Kolona:	Propylaminová 250 · 4mm, 5 µm
Detekce:	221nm
Průtok MF:	1ml/min (vysoký tlak na koloně)
Teplota kolony:	25°C
Nástřík:	20µl
Rozpouštědlo:	H ₂ O, MeOH, EtOH (jednotlivě)
Koncentrace vzorku:	5mg/50ml z tohoto roztoku 5ml/50ml →10mg/L

Tab. č. 7 Metoda RP005

MF: MeOH/H₂O	(35/65)
Kolona:	Propylaminová 250 · 4mm, 5 µm
Detekce:	221nm
Průtok MF:	1,5ml/min (vysoký tlak na koloně)
Teplota kolony:	25°C
Nástřík:	20µl
Rozpouštědlo:	H ₂ O, MeOH, EtOH (jednotlivě)
Koncentrace vzorku:	5mg/50ml z tohoto roztoku 5ml/50ml →10mg/L

Tab. č. 8 Metoda RP006

MF: MeOH/H₂O	(35/65) okyselení 1,16ml 85% H ₃ PO ₄
Kolona:	Propylaminová 250 · 4mm, 5 µm
Detekce:	221nm
Průtok MF:	1,5ml/min (vysoký tlak na koloně)
Teplota kolony:	25°C
Nástřík:	20µl
Rozpouštědlo:	H ₂ O, MeOH, EtOH (jednotlivě)
Koncentrace vzorku:	5mg/50ml z tohoto roztoku 5ml/50ml →10mg/L

REVERZNÍ FÁZE**Tab. č. 9 Metoda RP007**

Tab. č.9	Metoda RP007
MF: ACN/H₂O	(45/55)
Kolona:	LiChrospher RP-Select B 250 · 4mm, 5 µm
Detekce:	221nm
Průtok MF:	1,5ml/min
Teplota kolony:	25°C
Nástřík:	20µl
Rozpouštědlo:	H ₂ O, MeOH, (jednotlivě)
Koncentrace vzorku:	5mg/50ml z tohoto roztoku 5ml/50ml →10mg/L

4 Výsledky a diskuze

4.1.1 Úvod do problematiky

Jak již bylo zmíněno v kapitole týkající se výběru kolon, vzhledem k polaritě stanovované substance a povaze MF (USP) metody, by správná cesta vývoje nové metody na stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém rozpouštědle mohla vést, při správném výběru kolony, přes HILIC separaci, či klasickou separaci na reverzních fázích. Při vývoji metody, jejím přenosu, se pro mě stal jako stěžejní cíl dosáhnout vyššího retenčního času hlavní komponenty. V zavedené USP metodě na stanovení čistoty Riluzol eluuje cca ve 2,5min a z hlediska separace je vyhovující. Problém nastává, pokud je Riluzol rozpuštěn v organických rozpouštědlech, která poskytují detekovatelný pík (rozpouštědla) v počátečních časech separace. Musela jsem tedy docílit dostatečného rozseparování píku organického rozpouštědla od píku Riluzolu.

4.1.2 Přehled použitých metod

HILIC

Pro vývoj metody na stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém rozpouštědle pomocí HILIC interakcí jsem měla k dispozici pouze kolonu propylaminového typu. Výrobce kolon s tímto druhem náplně sice neuvádí její využití v HILIC systému, ale v odborné literatuře týkající se HILIC chromatografie je nosič s chemicky navázanými propylaminovými skupinami zmíněn. Jedná se o kolonu se strukturou, která se sice dá použít na HILIC separace, ovšem je ze všech možných typů kolon používaných pro tyto účely vhodná nejméně. Delší styk NH_2 s vodou totiž způsobuje částečnou hydrolýzu této skupiny, která má za následek vysoce alkalické prostředí v pórech kolony (cca až $\text{pH}=10$) a rozpouštění silikagelu. Významnou vlastností této skupiny se stává její snadná substituce. Dále by se aminopropylová skupina dala popsat svou reaktivitou (např: reaguje s aldehydy, či ketony za vzniku iminů) a možností se oxidovat (např: peroxidy). Obecně se dá říci, že retenční časy látek (obzvláště kyselé povahy) bývají vyšší (větší zadrž) oproti nosičům tvořeným z aluminy, klasických silikagelů, kyanpropylů, či diolů. Tato vlastnost vyhovovala mému zamýšlenému účelu, a to snaze zvýšit retenční čas Riluzolu oproti klasické USP metodě v již už popsáném HPLC systému. Retenční čas Riluzolu okolo 2,5 minuty v zavedené USP metodě by zasahoval do nerovnosti základní linie organických oplachových rozpouštědel. Tím by se jednak nedal určit přesný obsah Riluzolu

v těchto rozpouštědlech a dále by to vedlo k vysokým hodnotám LOQ a LOD. První nutností tedy bylo docílit kvalitního rozseparování píku organického rozpouštědla od píku Riluzolu.

Reverzní fáze

Vzhedem k již několikrát zmiňované polaritě sledované substance nebyl důvod se domnívat, že by separace nefungovala v systému reverzních fází na běžně dostupných kolonách používaných v těchto systémech. Po nezdařilých pokusech s HILIC chromatografií jsem nakonec v systému reverzních fází docílila úspěšné separace.

4.2 Limity parametrů nově vyvinuté HPLC metody na stanovení obsahu substance Riluzolu

Vybrané sledované veličiny a jejich limity jsou v souladu s parametry lékopisných metod.

Tabulka č. 10 Limity vybraných naměřených veličin

Sledovaná veličina	Limit
RSD ploch	$\leq 5\%$
Tailing faktor	$\leq 2,0$
Symetrie píku v 10% výšky	$\leq 2,0$
Počet teoretických pater	≥ 5000
LOQ substance Riluzolu	okolo 0,05mg/L
Hodnota R (Linearita)	$\leq 0,999$
Hodnota QC koeficientu (Linearita)	$\leq 3,0\%$

4.3 Naměřená data jednotlivých metod

Metoda RP001

Rozpouštědlo: H₂O $t_R = 1,9$ min., $H = 714,3$, symetrie v 10% = 0,93, tailing faktor = 0,96

MeOH $t_R = 1,2$ min., $H = 532,4$, symetrie v 10% = 2,24, tailing faktor = 1,60

EtOH $t_R = 1,1$ min., $H = 508,4$, symetrie v 10% = 5,10, tailing faktor = 2,80

Komentář: Zcela nevyhovující t_R sledové substance. Pík substance eluoval v podobném čase jako pík rozpouštědla. Faktory určující kvalitu separace byly v mezi tolerance naměřeny pouze u Riluzolu rozpuštěného ve vodě.

Metoda RP002

Rozpouštědlo: H₂O $t_R = 1,6$ min., $H = 824,9$, symetrie v 10% = 0,92, tailing faktor = 0,92

MeOH $t_R = 1,6$ min., $H = 508,4$, symetrie v 10% = 1,44, tailing faktor = 1,22

EtOH $t_R = 1,5$ min., $H = 493,0$, symetrie v 10% = 5,60, tailing faktor = 3,27

Komentář: Snížení průtoku MF v podstatě neovlivnilo nevyhovující t_R sledové substance. Pík substance eluoval v podobném čase jako pík rozpouštědla. Faktory určující kvalitu separace byly naměřeny v mezi tolerance u Riluzolu rozpuštěného ve vodě a v MeOM (jednotlivě).

Metoda RP003

Rozpouštědlo: H₂O $t_R = 1,2$ min., $H = 649,9$ symetrie v 10% = 1,45, tailing faktor = 1,23

MeOH $t_R \rightarrow$ rozštěpený pík v $t_R = 1,2$

EtOH $t_R = 1,2$ min., $H = 370,6$, symetrie v 10% = 1,73, tailing faktor = 1,84

Komentář: t_R sledované substance se překrývá s t_R píku organického rozpouštědla. Separční parametry metody v organických rozpouštědlech nevyhovují danému cíli.

Metoda RP004

Rozpouštědlo: H₂O $t_R = 2,5$ min., rozštěpený pík

MeOH $t_R = 2,5$ min., $H = 248,3$, symetrie v 10% = 1,69, tailing faktor = 1,36

EtOH $t_R = 2,5$ min., $H = 321,6$, symetrie v 10% = 1,10, tailing faktor = 1,93

Komentář: Celkově nevyhovující naměřená data, jednak z hlediska symetrie píku ve všech použitých rozpouštědlech a dále z překrytí píků Riluzolu a píků organických rozpouštědel.

Metoda RP005

Rozpouštědlo: H₂O $t_R = 1,7$ min., $H = 207,4$, symetrie v 10% = 0,58, tailing faktor = 0,78

MeOH $t_R = 1,6$ min., $H = 168,5$, symetrie v 10% = 2,47, tailing faktor = 1,78

EtOH → Rozštěpený pík v $t_R = 1,7$ min.

Komentář: Celkově nevyhovující naměřená data, jednak z hlediska symetrie píku ve všech použitých rozpouštědlech a dále z překrytí píků Riluzolu a píků organických rozpouštědel.

Metoda RP006

Rozpouštědlo: H₂O $t_R = 1,2$ min., $H = 217,4$, symetrie v 10% = 1,24, tailing faktor = 1,15

MeOH $t_R = 1,2$ min., $H = 207,4$, symetrie v 10% = 1,26, tailing faktor = 1,19

EtOH $t_R = 1,2$ min., $H = 169,9$, symetrie v 10% = 1,64, tailing faktor = 1,66

Komentář: t_R substance před píkem rozpouštědla ve všech nástřicích. Na propylaminové koloně jsem nedosáhla optimalizace t_R . Separální parametry této metody poskytovaly dobré výsledky. Problém by nastal při eluci píku sledované substance v pozdějším t_R např. vlivem MF (robustnost metody). V dalším kroku vývoje proto přecházím na kolonu běžně používanou v systému reverzních fází.

Metoda RP007

Rozpouštědlo: H₂O $t_R = 5,9$ min., H = 123,0, symetrie v 10% = 1,17, tailing faktor = 1,10

MeOH → viz. kapitola Výsledky validace vyvinuté metody

Komentář: Vyhovující t_R substance ve H₂O i v MeOH. Ostatní naměřené parametry také vyhovují danému cíli.

4.4 Výsledky validace vyvinuté metody

Tabulka č. 11 Výsledky validace metody RP007

Výsledky validace metody RP007	
RSD ploch (roztoku o koncentraci 0,03mg/L)	0,03%
Počet teoretických pater (roztok o koncentraci 1mg/L)	6832
Tailing factor (roztok o koncentraci 1mg/L)	1,0
Symetrie píku v 10% výšky (roztok o koncentraci 1mg/L)	1,0%
Limit kvantifikace LOQ (mg/l)	0,0297
Hodnota R (Linearita)	0,9993
Hodnota QC koeficientu (Linearita)	2,68%

Výše uvedené výsledky svědčí o vysoké kvalitě nově vyvinuté HPLC metody na stanovení obsahu substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH). Metoda vyhovuje danému cíli a lékopisným normám. Průběh validace, detailní postup, naměřené veličiny a výpočty jsou součástí této práce (uvedeny v příloze ve validační zprávě).

4.5 Srovnání se spektrofotometrickou metodou

Zvalidovaná HPLC metoda byla srovnána se zavedenou spektrofotometrickou metodou. Z výrobní aparatury byl odebrán oplachový MeOH po výrobě Riluzolu ze čtyř odběrových míst. Vzorky byly odebrány z násadového kotle, filtru, krystalizátoru a sušícího filtru ve dvou časových úsecích a to po 8 hodinovém a 12 hodinovém oplachu aparatury.

Tab. č. 12 Obsahy Riluzolu ve vzorcích (HPLC)

Naměřená koncentrace reálných MeOH oplachů po výrobě Riluzolu HPLC metoda RP007				
Odběrové místo	násadový kotel	filtr	krystalizátor	sušící filtr
Koncentrace (mg/l) 1.oplach	0,95	0,73	0,86	0,097
Koncentrace (mg/l) 2.oplach	0,60	0,36	0,52	0,053

Tab. č. 13 Obsahy Riluzolu ve vzorcích (spektrofotometrická metoda)

Naměřená koncentrace reálných MeOH oplachů po výrobě Riluzolu spektrofotometrická metoda				
Odběrové místo	násadový kotel	filtr	krystalizátor	sušící filtr
Koncentrace (mg/l) 1.oplach	0,98	0,74	0,84	0,086
Koncentrace (mg/l) 2.oplach	0,63	0,41	0,52	0,081

Lze říci, že se naměřené koncentrace substance Riluzolu v MeOH oplachovém rozpouštědle u obou metod téměř shodují. Při nižších koncentracích Riluzolu ve vzorku byly naměřeny odlišné hodnoty (setiny mg/l) mezi spektrofotometrickou a HPLC metodou. Koncentrace vzorků zanalyzované HPLC metodou by měly být přesnější. Validační zpráva spektrofotometrické metody na stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém rozpouštědle udává hodnotu LOQ pouze 0,35 mg/l. Naměřené koncentrace vzorků poukazují na správnost vyvinuté HPLC metody i zavedené spektrofotometrické metody.

5 Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout HPLC metodu na stanovení obsahu lékové substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle. V prvních krocích vývoje jsem se ve vytvářených metodách pokoušela nastínit podmínky vhodné pro HILIC interakce. Separace pomocí interakcí tohoto typu se mi nezdařila. Nutná podmínka zdařilé metody vedla přes posun retenčního času (větší zadržet v systému) Riluzolu. Toho se mi na propylaminové koloně v HILIC systému nepodařilo dosáhnout. V dalším kroku vývoje metody jsem postupovala přes návrat k reverzním fázím, tedy k původním podmínkám USP metody na stanovení nečistot Riluzolu. Zavedený druh kolony v USP metodě nevyhovoval danému cíli, tudíž jsem vyzkoušela jiný typ kolony C18. Separace na nově vyzkoušené analytické koloně byla zdařilá, čímž jsem dosáhla modifikace lékopisných podmínek na stanovení nečistot Riluzolu. Dalšími mírnými zásahy do původní metody, jako je např. optimalizace velikosti násřiku analytu a průtoku mobilní fáze v systému bylo dosaženo stanoveného cíle. Novou HPLC metodu vhodnou pro účel stanovení obsahu Riluzolu v oplachových rozpouštědlech bylo pro potvrzení její správnosti a přesnosti nutné podrobit validaci. Naměřené validační parametry určující kvalitu separace (jako jsou symetrie píku v 10% jeho výšky, či tailing faktor s počtem teoretických pater) vyhovovaly lékopisným normám a zadanému cíli. Specifičnost potvrdila, že hlavní komponenta substance Riluzol byla ve zvoleném systému kolona-mobilní fáze dobře separována od mrtvého času kolony. Počet teoretických pater (6832) zajišťoval dobrou účinnost systému. Přesnost metody vyjádřená hodnotami RSD ploch (0,03%) splňovala požadované limity. Ve sledovaném koncentračním rozmezí byla zaručena linearita (prokázána na základě hodnot R (0,993) a QC koeficientu (2,68%)). Limit kvantifikace (0,03mg/L) substance Riluzolu vykazovala nová metoda nižší, než požadovaná limitní koncentrace 0,3mg/L. Ověření LOQ, vyjádřené hodnotami RSD ploch (1,506%), potvrzovalo přesnost tohoto limitu. V rozsahu 0,03mg/L až 1,00mg/L prokazuje vyvinutá metoda přesnost, správnost a linearitu. Získaná validační data potvrzovala, že vyvinutá HPLC metoda na stanovení obsahu substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH) je validní a dostatečně spolehlivá. Přesnost vyvinuté HPLC metody potvrzovaly i naměřené koncentrace Riluzolu v reálných vzorcích oplachů po kampani této substance donesených z výrobní aparatury, které byly podrobeny HPLC a spektrofotometrické analýze. Výsledky

HLPC metody byly porovnány s výsledky referenční spektrofotometrické metody. Bylo zjištěno, že se i v limitních koncentracích shodovaly.

Seznam použité literatury

1. Miller R. G., Mitchell J. D., Moore D. H., "[Riluzol pro amyotrofické laterální sklerózy \(ALS\) / onemocnění motorických neuronů \(MND\)](#)" (2012) (PDF) *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3:.. CD001447 [doi :10.1002/14651858.CD001447.pub3](#) . [PMID 22419278](#) .
2. AMBLER Z., Amyotrofická laterální skleróza. *Neurologie pro praxi*. (2006) 1 vyd., 9-12. [Dostupné online](#). [ISSN 1803-5280](#)
3. [Ereska.cz, ALS - amyotrofická laterální skleróza](#), 12. 11. 2014 v 13:00 [Dostupné online](#).
4. Bonvicini F., Marcello N., Mandrioli J., Pietrini V., Vinceti M., Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study *Ann Ist Super Sanita*, (2010) 46(3):284-7. [PMID 20847462](#)
5. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies: Pesticide exposure as a risk factor for ALS. By Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A, Talbott EO. *Environ Res*. 2012 Aug; 117:112-9. [PMID 22819005](#)
6. Vinceti M., Bottecchi I., Fan A., Finkelstein Y., Mandrioli J., Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health*. (2012) 27(1):19-41. [PMID 22755265](#)
7. Kamel F., Umbach D. M., Bedlack R. S., Richards M., Watson M., Alavanja M. C., Blair A., Hoppin J. A., Schmidt S., Sandler D. P., Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis *Neurotoxicology* (2012) 33(3):457-62. [PMID 22521219](#)
8. www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a696013.html - 10.02. 2015 v 8:50
9. Jagupolskij L. Z., Gandelsman L. Z., *Zh. Obshch. Khim.* (1963) 33, 2301.
10. <http://alsn.mda.org./news/generic-riluzole-market>
11. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis (2009) ISBN 978-80-247-2994-7
12. European Pharmacopoeia Edition 7.0, Volume 1, The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (2011)
13. USP 37, NF 32, Volume 3, str. 4580-4581.
14. USP 34, NF 29, Volume 3, str. 4155-4156.
15. Nováková L., Douša M. a kolektiv: Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1. Vyd. Praha: Nakladatelství Europrint a. s. 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3
16. Sommer, L. a kolektiv: Základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: Nakladatelství VUTIUM. 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0
17. http://muniche.linde.com/international/web/lg/spg/like351gspg.nsf/docbyalias/image_hplc – 03. 01. 2015 v 10:00
18. Karlíček R. a kolektiv: Analytická chemie pro farmaceuty. 3. Vyd. Praha: Karolinium. 2007. 279 s. ISBN 978-80-296-1453-3

19. Drbal K., Křížek M.: Analytická chemie, České Budějovice (1999)
20. Kellner, R. et al.: Analytical chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. (1998) 916 s. ISBN 3-527-28881-3
21. www.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf - 7. 12. 2014 v 9: 45
22. Nováková L., Douša M. a kolektiv: Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1. Vyd. Praha: Nakladatelství Europrint a. s. (2013) ISBN: 978-80-260-4243-3
23. Grushka E., Myers N. M., Schettler P. O., Giddings J. C., *Anal. Chem.* 41 (1969) 889.
24. Cusó E., Guardino X., Riera J. M., *J. Chromatogr.* 95 (1974) 147.
25. Purnel J. H., *J. Chem. Soc.* (1960) 1268.
26. <http://ach.upol.cz/ucebnice/hodnoceni3.htm> - 26. 12. 2014 v 13:52
27. Snyder L. R., *Anal. Chem.* 46 (1974) 1384.
28. Soczewiński E., *Anal. Chem.* 41 (1969) 179.
29. Nawrocki J., *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
30. Meyer V. R.: Practical HPLC, 4th edition, Wiley, New York (2004)
31. Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Prada-Rodríguez D., *J. Chrom. Sci.* 47 (2009) 121.
32. Snyder L. R., Kirkland J. J.: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York (1979)
33. Telepchak M. J., *Chromatographia* 6 (1973) 234.
34. Colin H., Guiochon G., *J. Chromatogr.* 158 (1978) 183.
35. Murakami F., *J. Chromatogr.* 178 (1979) 393.
36. Horváth C., Melander W., Molnár I., *J. Chromatogr.* 125 (1976) 129.
37. Berendsen G. E., Galan L., *J. Chromatogr.* 196 (1980) 21.
38. Jandera P., Engelhardt H., *Chromatographia* 13 (1980) 18.
39. Churáček J. a kol.: Analytická separace látek, SNTL Praha (1990)
40. Jandera P., Fischer J., Lahovská H., Novotná K., Česla P., Kolářová L., *J. Chromatogr. A* (2006), 1119, 3-10.
41. Buszewski B., Noga S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 402, (2012) 231.
42. McCalley D. V., *J. Chromatogr. A* (2007), 1171, 46-55.
43. Olsen B. A., *J. Chromatogr. A* (2001), 913, 112-122.
44. Risley D. S., Strega M. A., *Anal. Chem.* (2000), 72, 1736-1739.
45. Alpert A. J., *J. Chromatogr.* (1990), 449, 177-196.
46. Karlsson G., Winge S., Sandberg H., *J. Chromatogr. A* (2005), 1092, 246-249.

47. Jiang W., Irgum K., *Anal. Chem.* (2002), 74 (1993-2003)
48. Itoh S., Roemling R.: HILIC-MS- High Resolution and Sensitivity for the Analysis of Very Polar compounds, <http://www.separations.eu.tosohbioscience.com> - 26. února 2015 v 8:15
49. Grumbach E. S., Diehl D. M., Neue U. D.: *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1511.
50. Heaton J., Smith N. W.: *Chromatography today* (2012) 44.
51. Brown S. D., White C. A., Bartlett M. G., *Rapid Commun. Mass Spectrom* (2012), 16, 1871-1876.
52. Classens H. A., Straten M. A.: *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 23.
53. Mendez A., Bosch E., Roses M., Neue U. D.: *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 33.
54. Eakins W. J., *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 7 (1968) 39.
55. Nawrocki J., Dunlap C., McCormick A., Carr P. W., *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1.
56. <http://www.zirchrom.com/newsletter.asp> – 26.02.2015 v 8.00
57. Laurent C. J. C. M., Ph. D., Technische Hogeschool, Delft (1983)
58. Storer M. K., McEntyre C. J., Lever M.: *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 63.
59. Kirkland J. J., van Straten M. A., Classens H. A., *J. Chromatogr. A* 961 (1995) 3.
60. Dong M. W.: *Modern HPLC for practicing scientist*, Wiley, New York, 2006, ISBN 0-471-72789-7
61. www.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf - 7. 12. 2014 v 9:50
62. Jandera P., Churáček J., *J. Chromatogr.* 192 (1980) 19.
63. Praus P., Plachá D.: *Vybrané kapitoly z instrumentální analýzy, studijní opora*, Ostrava, VŠB- TUO (2009) 206.
64. Nováková L., Douša M. a kolektiv: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, Praha (2013) 46s. ISBN 978-80-260-4243-3
65. Asshauer J., Halász J., *J. Chromatogr. Sci* 12 (1974) 39.
66. Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W., *Introduction to modern liquid chromatography*, third edition, Wiley-Interscience, USA (2010)
67. VYR 26, Pokyny pro SVP při výrobě léčivých látek. SÚKL (2003)
68. VYR 32, Pokyny pro SVP při výrobě léčivých látek Parth II, SÚKL (2011)
69. ICH Q7A, Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients
70. ICHQ2(R1) Validation of Analytical Procedures, Step 4 version (2005)
71. Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines, The rules governing medicinal products in the European Union

72. Code of federal Regulations Title 21- food and drugs charter I- food and drugs
administrativ department of health and human services subchapter C- Drugs: General
Parth 211 current good manufacturing practice for finished pharmaceuticals
73. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, ISO 9001 (2009)

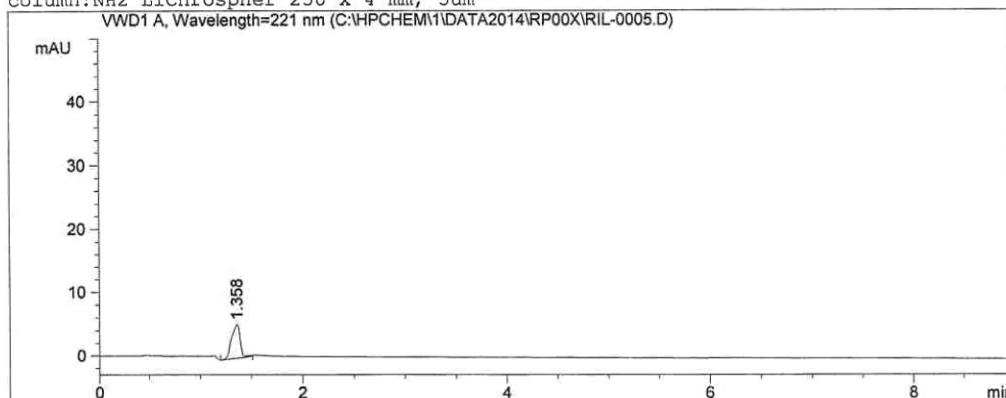
Příloha 1: Chromatogram oplachového rozpouštědla (MeOH) metody RP001

Data File C:\HPCHEM\1\DATA2014\RP00X\RIL-0005.D

Sample Name: Blank

Riluzol in the rising solution
solvent run MeOH

```
=====
Injection Date   : 07.11.14 15:12:19          Seq. Line :    5
Sample Name      : Blank                      Location  : Vial 5
Acq. Operator    : Mgr.Hanková                Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP001.M
Last changed     : 07.11.14 12:33:27 by Mgr.Linhartová
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP001.M
Last changed     : 11.02.15 12:20:46 by Mgr.Linhartová
Riluzol - assay
column:NH2 LiChrospher 250 x 4 mm, 5µm
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 12:19:37
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	1.100		0.0000	0.00000	0.0000	RILUZOL
2	1.358	VB	0.0881	32.13740	100.0000	?

Totals : 32.13740

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

Příloha 2: Chromatogram Riluzolu v oplachovém rozpouštědli (MeOH); metoda RP001

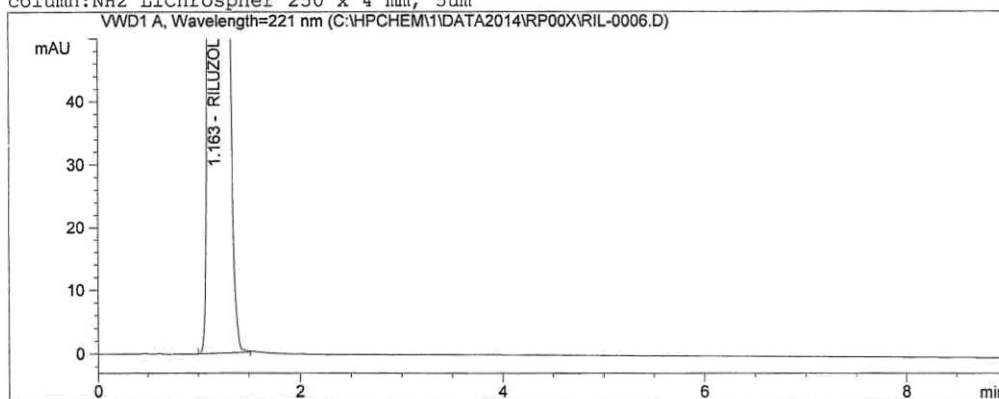
Data File C:\HPCHEM\1\DATA2014\RP00X\RIL-0006.D

Sample Name: Riluzol

Brimonidin tartarat v.p. - purity
Riluzol standard MeOH

```
=====
Injection Date   : 07.11.14 15:22:37          Seq. Line :    6
Sample Name     : Riluzol                    Location  : Vial 6
Acq. Operator   : Mgr.Hanková                Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP001.M
Last changed    : 07.11.14 12:33:27 by Mgr.Linhartová
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP001.M
Last changed    : 11.02.15 12:20:46 by Mgr.Linhartová
Riluzol - assay
column:NH2 LiChrospher 250 x 4 mm, 5µm
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 12:19:37
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	1.163	PB	0.1236	4310.09570	100.0000	RILUZOL

Totals : 4310.09570

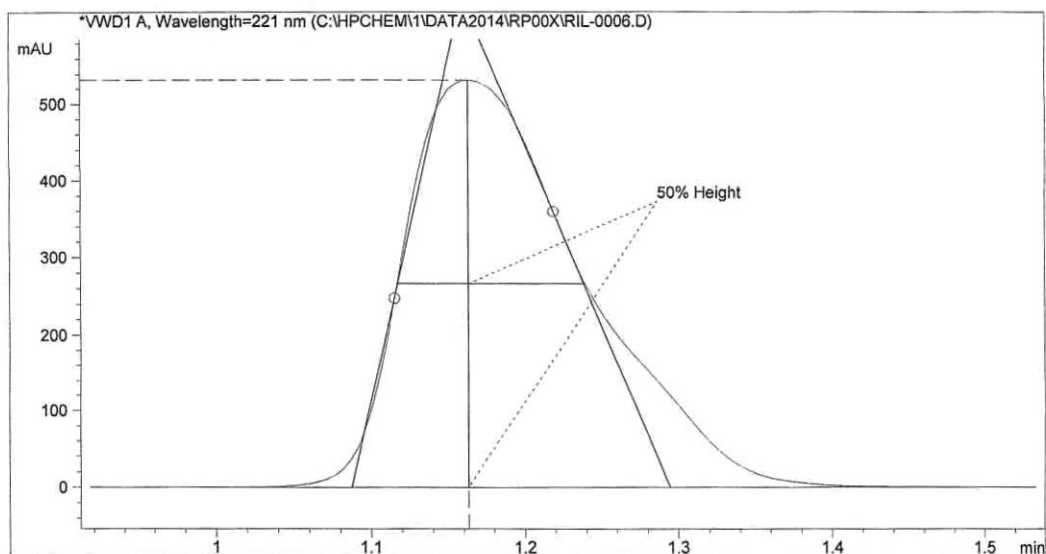
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Příloha 3: Macro Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH); metoda RP001

1

Peak Performance Evaluation



```

Ret. Time [min] t, t-t0:      1.163, 0
Void time (1st peak) t0:     1.163
k':                            -
Height [mAU]:                 532.446
Area [mAU*s]:                 4310.095
Peakwidth method:             Half height
Peakwidth [min]:              0.121
Peak Start [min]:             0.999
Peak End [min]:               1.514
Skew:                          0.609
Excess:                        0.107
Symmetry (from integrator):   0.516
Symmetry (at 10% height):    2.238
USP Tailing:                   1.631
Noise at peak baseline [mAU]: 0.0732
Signal to noise ratio:        7265.5
Integration Type:              PB
Time Increment [ms]:          291.2
Data Points:                   128
0. Moment [mAU*s]:            4307.018
1. Moment [min]:               1.191
2. Moment [s^2]:               11.27
3. Moment [s^3]:               23.04
4. Moment [s^4]:               394.82
Efficiency [Plates/Column]:   509
Efficiency [Plates/Meter]:     -
Foley Dorsey [Plates/Column]: 304
Foley Dorsey [Plates/Meter]:   -
Selectivity to prev peak:     -
Selectivity to next peak:     -
Resolution to prev peak:      -
Resolution to next peak:      -
    
```


Příloha 4: Chromatogram oplachového rozpouštědla (MeOH) metody RP002

Data File C:\HPCHEM\1\DATA2014\RP00X\RIL-0011.D

Sample Name: Blank

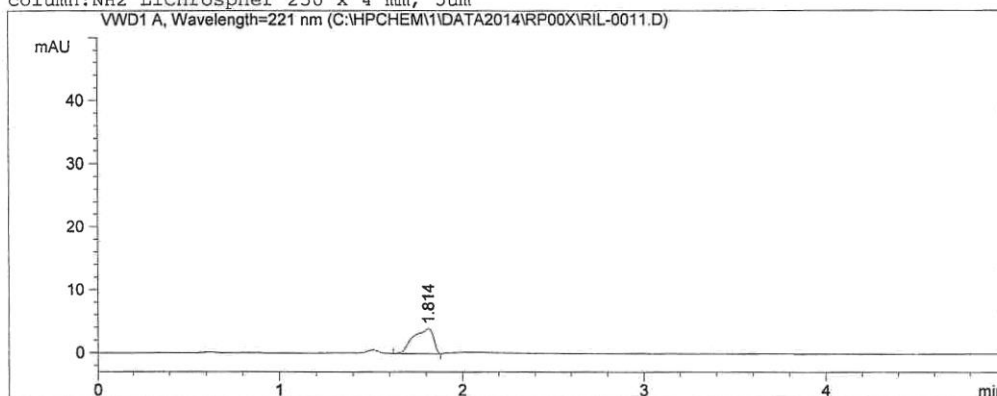
Riluzol in the rising solution
solvent run MeOH

```

=====
Injection Date   : 07.11.14 16:03:33          Seq. Line :    3
Sample Name     : Blank                      Location  : Vial 3
Acq. Operator   : Mgr.Hanková                Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl
=====
  
```

```

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP002.M
Last changed    : 07.11.14 15:37:00 by Mgr.Hanková
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP002.M
Last changed    : 11.02.15 12:30:26 by Mgr.Linhartová
Riluzol - assay
column:NH2 LiChrospher 250 x 4 mm, 5µm
  
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 12:29:14
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	1.606		0.0000	0.00000	0.0000	RILUZOL
2	1.814	VP	0.1049	30.37981	100.0000	?

Totals : 30.37981

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

Příloha 5: Chromatogram Riluzolu v oplachovém rozpouštědli (MeOH); metoda RP002

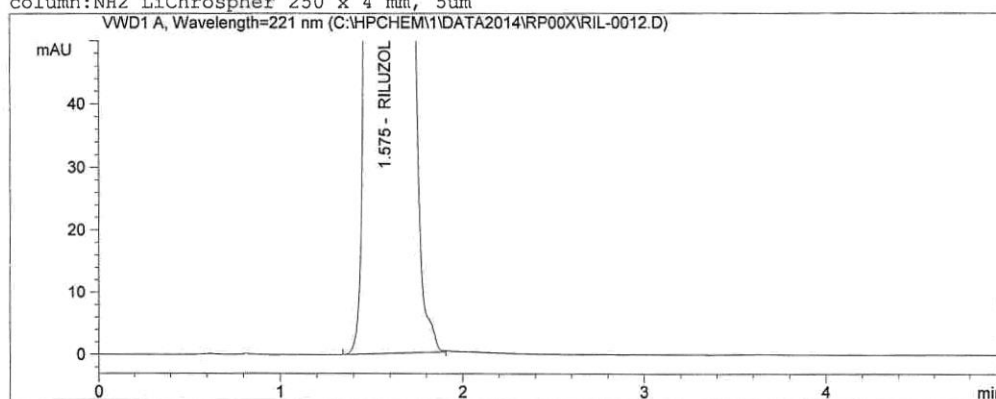
Data File C:\HPCHEM\1\DATA2014\RP00X\RIL-0012.D

Sample Name: Riluzol

Brimonidin tartarat v.p. - purity
Riluzol standard MeOH

```
=====
Injection Date   : 07.11.14 16:09:58           Seq. Line :    4
Sample Name     : Riluzol                     Location  : Vial 4
Acq. Operator  : Mgr.Hanková                  Inj       :    1
                                                Inj Volume: 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP002.M
Last changed   : 07.11.14 15:37:00 by Mgr.Hanková
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RP002.M
Last changed   : 11.02.15 12:30:26 by Mgr.Linhartová
Riluzol - assay
column:NH2 LiChrospher 250 x 4 mm, 5µm
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 12:29:14
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	1.575	BB	0.1724	5671.07031	100.0000	RILUZOL

Totals : 5671.07031

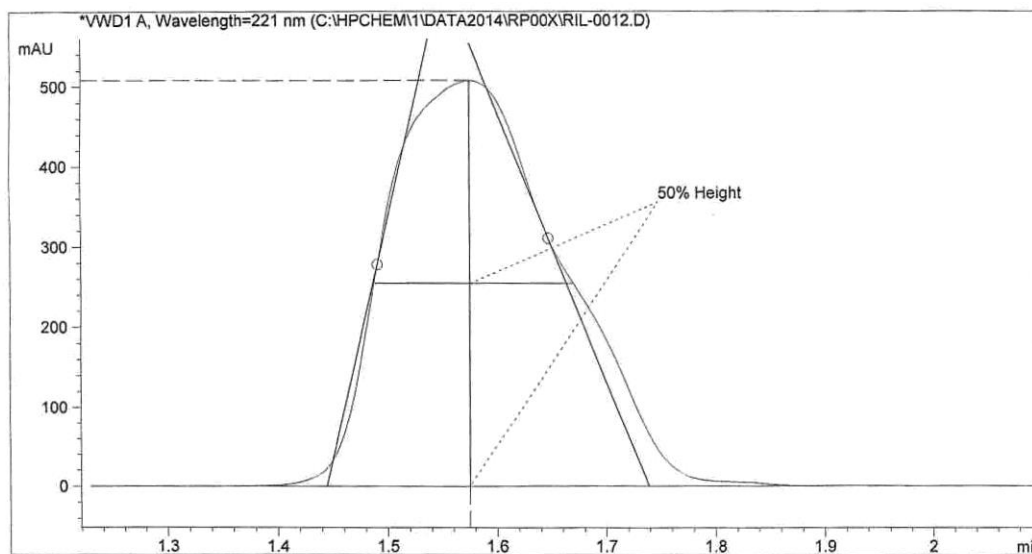
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Příloha 6: Macro Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH); metoda RP002

1

Peak Performance Evaluation



Ret. Time [min] t, t-t0:	1.574, 0
Void time (1st peak) t0:	1.574
k':	-
Height [mAU]:	508.407
Area [mAU*s]:	5671.07
Peakwidth method:	Half height
Peakwidth [min]:	0.181
Peak Start [min]:	1.341
Peak End [min]:	1.907
Skew:	0.378
Excess:	-0.278
Symmetry (from integrator):	0.827
Symmetry (at 10% height):	1.444
USP Tailing:	1.224
Noise at peak baseline [mAU]:	0.0059
Signal to noise ratio:	84974.7
Integration Type:	BB
Time Increment [ms]:	291.2
Data Points:	179
0. Moment [mAU*s]:	5667.885
1. Moment [min]:	1.589
2. Moment [s^2]:	17.35
3. Moment [s^3]:	27.36
4. Moment [s^4]:	819.73
Efficiency [Plates/Column]:	418
Efficiency [Plates/Meter]:	-
Foley Dorsey [Plates/Column]:	468
Foley Dorsey [Plates/Meter]:	-
Selectivity to prev peak:	-
Selectivity to next peak:	-
Resolution to prev peak:	-
Resolution to next peak:	-

Příloha 7: Chromatogram oplachového rozpouštědla (MeOH) metody RP003

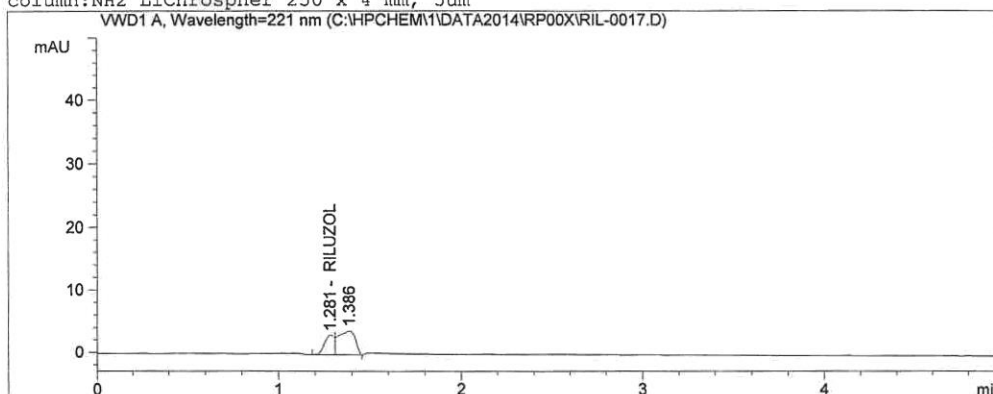
Data File C:\HPCHEM\1\DATA2014\RP00X\RIL-0017.D

Sample Name: Blank

Riluzol in the rising solution
solvent run MeOH

```
=====
Injection Date   : 07.11.14 16:55:44          Seq. Line :    3
Sample Name     : Blank                      Location  : Vial 3
Acq. Operator   : Mgr.Hanková                Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl
=====
```

```
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP003.M
Last changed    : 07.11.14 15:38:21 by Mgr.Hanková
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP003.M
Last changed    : 11.02.15 12:33:32 by Mgr.Linhartová
Riluzol - assay
column:NH2 LiChrospher 250 x 4 mm, 5µm
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 12:32:29
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Name
1	1.281	PV	0.0563	11.52068	32.0676	RILUZOL
2	1.386	VP	0.0930	24.40557	67.9324	?

Totals : 35.92625

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Příloha 8: Chromatogram Riluzolu v oplachovém rozpouštědli (MeOH); metoda RP003

Data File C:\HPCHEM\1\DATA2014\RP00X\RIL-0018.D

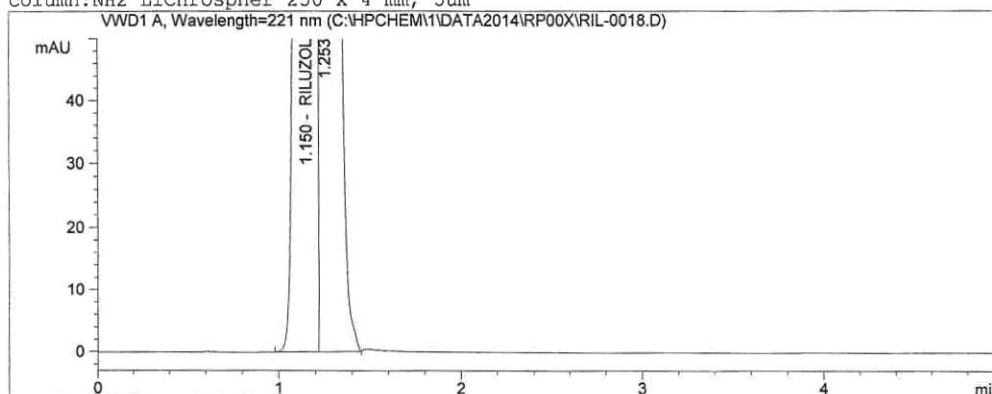
Sample Name: Riluzol

Brimonidin tartarat v.p. - purity
Riluzol standard MeOH

```

=====
Injection Date   : 07.11.14 17:01:56           Seq. Line :    4
Sample Name     : Riluzol                     Location  : Vial 4
Acq. Operator   : Mgr.Hanková                 Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP003.M
Last changed    : 07.11.14 15:38:21 by Mgr.Hanková
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RP003.M
Last changed    : 11.02.15 12:33:32 by Mgr.Linhartová
Riluzol - assay
column:NH2 LiChrospher 250 x 4 mm, 5µm
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 12:32:29
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	1.150	BV	0.1052	2533.85742	59.0752	RILUZOL
2	1.253	VV	0.0905	1755.34741	40.9248	?

Totals : 4289.20483

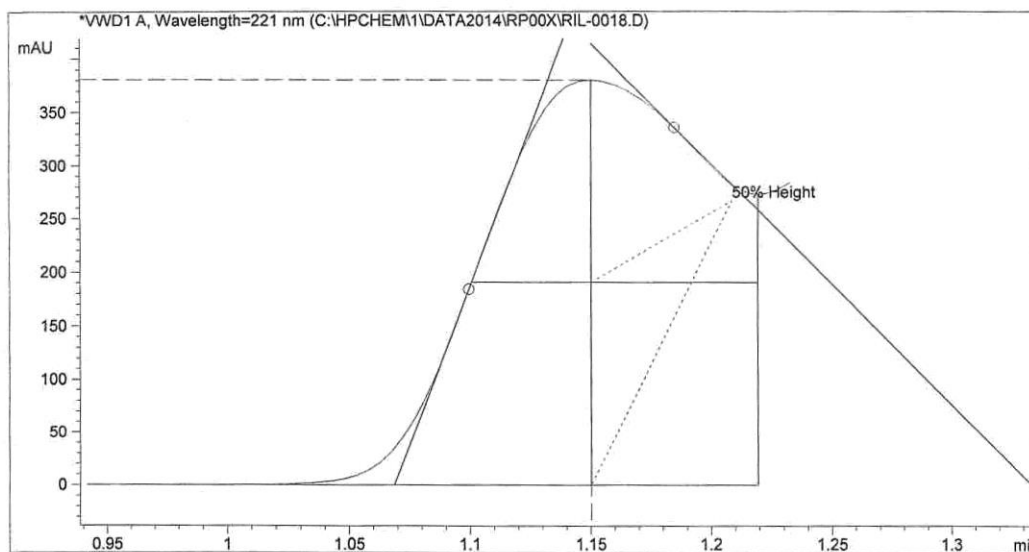
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Příloha 9: Macro Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH); metoda RP003

1

Peak Performance Evaluation



Ret. Time [min] t, t-t0:	1.15, 0
Void time (1st peak) t0:	1.15
k':	-
Height [mAU]:	381.108
Area [mAU*s]:	2533.857
Peakwidth method:	Half height
Peakwidth [min]:	0.118
Peak Start [min]:	0.98
Peak End [min]:	1.219
Skew:	0.142
Excess:	-0.72
Symmetry (from integrator):	0.88
Symmetry (at 10% height):	1.008
USP Tailing:	0.889
Noise at peak baseline [mAU]:	-
Signal to noise ratio:	-
Integration Type:	BV
Time Increment [ms]:	291.2
Data Points:	61
0. Moment [mAU*s]:	859.584
1. Moment [min]:	1.148
2. Moment [s^2]:	2.53
3. Moment [s^3]:	0.57
4. Moment [s^4]:	14.59
Efficiency [Plates/Column]:	523
Efficiency [Plates/Meter]:	-
Foley Dorsey [Plates/Column]:	1092
Foley Dorsey [Plates/Meter]:	-
Selectivity to prev peak:	-
Selectivity to next peak:	-
Resolution to prev peak:	-
Resolution to next peak:	0.615

Příloha 10: Chromatogram oplachového rozpouštědla (MeOH) metody RP004

Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0003.D

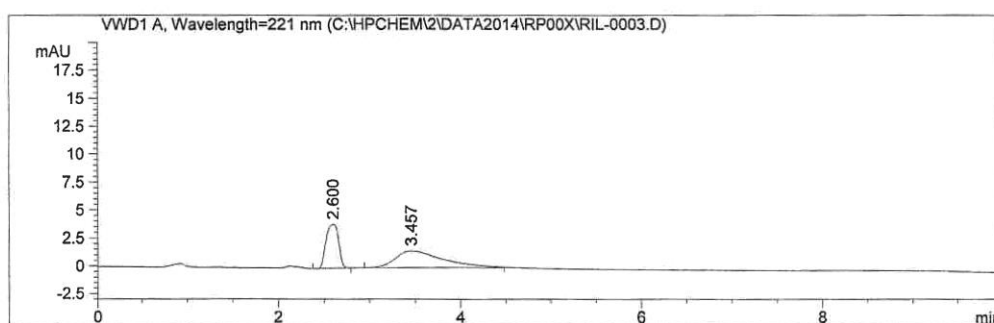
Sample Name: Blank

RILUZOL
Solvent run MeOH

```

=====
Injection Date   : 18.11.14 14:57:42          Seq. Line :    3
Sample Name     : Blank                      Location  : Vial 3
Acq. Operator  : Mgr.Hanková                 Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP004.M
Last changed   : 18.11.14 14:15:50 by Mgr.Hanková
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP004.M
Last changed   : 11.02.15 13:01:55 by Mgr.Linhartová
Riluzol in the rising solution
column:NH2
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 13:01:13
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Area %	Name
1	2.500		0.0000	0.00000	0.0000	0.0000	RILUZOL
2	2.600	PB S	0.1630	37.63979	40.2052	?	
3	3.457	BB	0.5398	55.97950	59.7948	?	

Totals : 93.61929

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

Příloha 11: Chromatogram Riluzolu v oplachovém rozpouštědli (MeOH); metoda RP004

Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0004.D

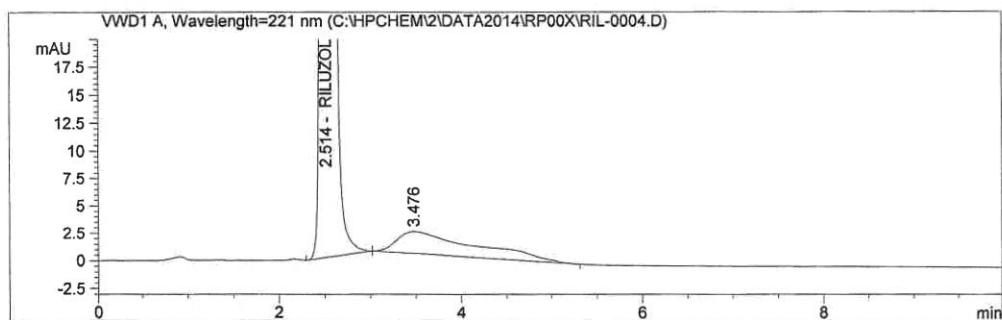
Sample Name: Standard

RILUZOL
standard 10mg/l MeOH

```

=====
Injection Date   : 18.11.14 15:08:55           Seq. Line :    4
Sample Name     : Standard                     Location  : Vial 4
Acq. Operator   : Mgr.Hanková                 Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP004.M
Last changed    : 18.11.14 14:15:50 by Mgr.Hanková
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP004.M
Last changed    : 11.02.15 13:03:20 by Mgr.Linhartová
Riluzol in the rising solution
column:NH2
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 13:01:13
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	2.514	BB	0.1163	1762.55347	93.4186	RILUZOL
2	3.476	BBA	0.8299	124.17284	6.5814	?

Totals : 1886.72631

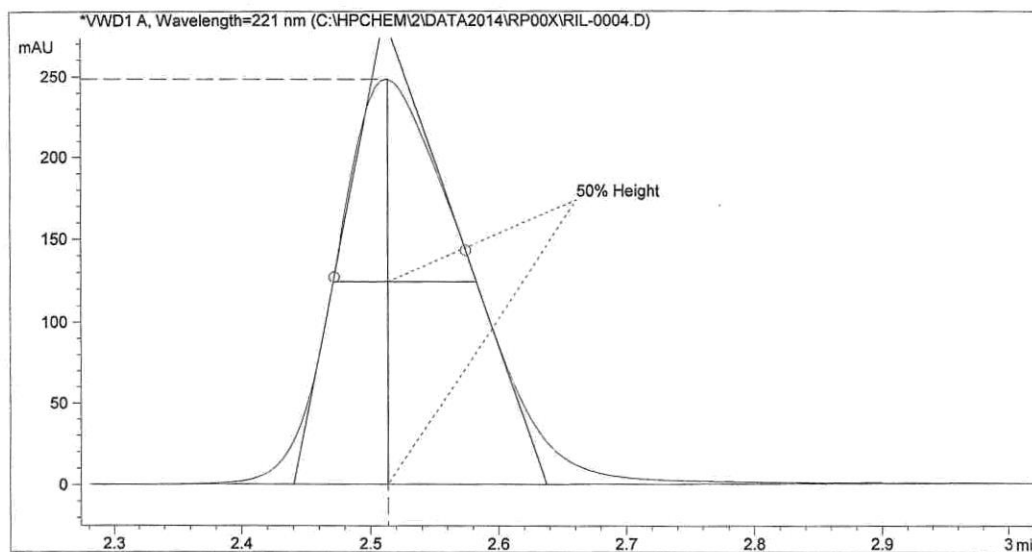
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Příloha 12: Macro Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH); metoda RP004

1

Peak Performance Evaluation



Ret. Time [min] t, t-t0:	2.513, 0
Void time (1st peak) t0:	2.513
k':	-
Height [mAU]:	248.332
Area [mAU*s]:	1762.553
Peakwidth method:	Half height
Peakwidth [min]:	0.11
Peak Start [min]:	2.293
Peak End [min]:	3.019
Skew:	1.25
Excess:	5.231
Symmetry (from integrator):	0.6
Symmetry (at 10% height):	1.688
USP Tailing:	1.362
Noise at peak baseline [mAU]:	0.0019
Signal to noise ratio:	124202.6
Integration Type:	BB
Time Increment [ms]:	291.2
Data Points:	153
0. Moment [mAU*s]:	1762.754
1. Moment [min]:	2.536
2. Moment [s^2]:	10.41
3. Moment [s^3]:	42.05
4. Moment [s^4]:	893.16
Efficiency [Plates/Column]:	2892
Efficiency [Plates/Meter]:	-
Foley Dorsey [Plates/Column]:	2264
Foley Dorsey [Plates/Meter]:	-
Selectivity to prev peak:	-
Selectivity to next peak:	-
Resolution to prev peak:	-
Resolution to next peak:	1.497

Příloha 13: Chromatogram oplachového rozpouštědla (MeOH) metody RP005

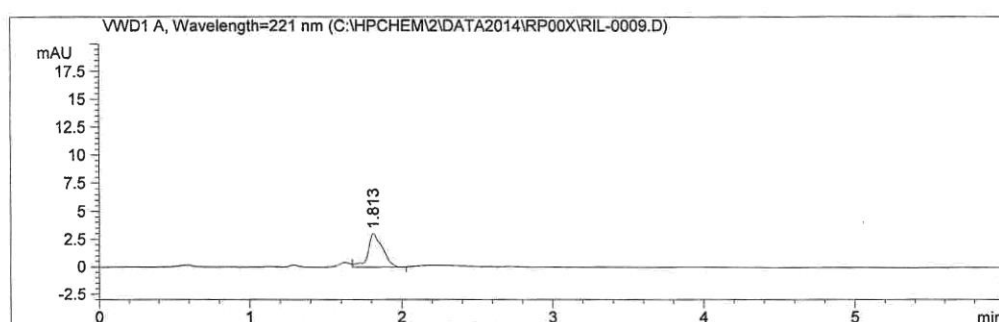
Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0009.D

Sample Name: Blank

RILUZOL
Solvent run MeOH

```
=====
Injection Date : 18.11.14 16:36:44      Seq. Line : 3
Sample Name    : Blank                  Location  : Vial 3
Acq. Operator  : Mgr.Hanková           Inj       : 1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP005.M
Last changed   : 18.11.14 16:10:05 by Mgr.Hanková
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP005.M
Last changed   : 11.02.15 13:06:29 by Mgr.Linhartová
Riluzol in the rising solution
column:NH2
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 13:06:23
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Area %	Name
1	1.700		0.0000	0.00000	0.0000	0.0000	RILUZOL
2	1.813	VB	0.0955	20.93242	100.0000	100.0000	?

Totals : 20.93242

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

Příloha 14: Chromatogram Riluzolu v oplachovém rozpouštědli (MeOH); metoda RP005

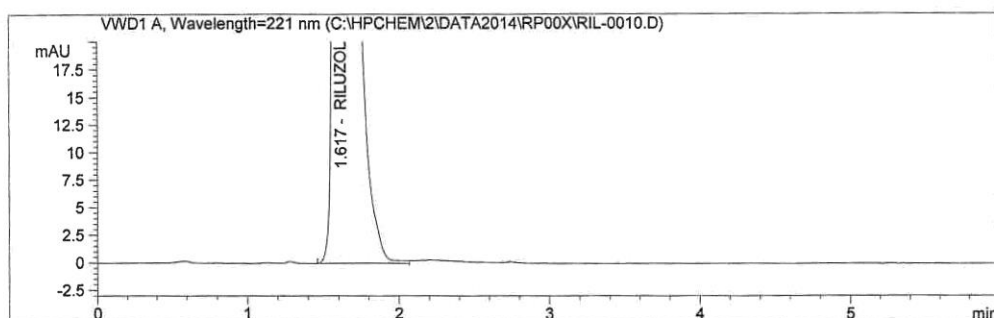
Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0010.D

Sample Name: Standard

RILUZOL
standard 10mg/l MeOH

```
=====
Injection Date   : 18.11.14 16:43:57          Seq. Line :    4
Sample Name     : Standard                    Location  : Vial 4
Acq. Operator  : Mgr.Hanková                 Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP005.M
Last changed   : 18.11.14 16:10:05 by Mgr.Hanková
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP005.M
Last changed   : 11.02.15 13:06:29 by Mgr.Linhartová
Riluzol in the rising solution
column:NH2
=====
```



Area Percent Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 13:06:23
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	1.617	BB	0.1072	1148.42187	100.0000	RILUZOL

Totals : 1148.42187

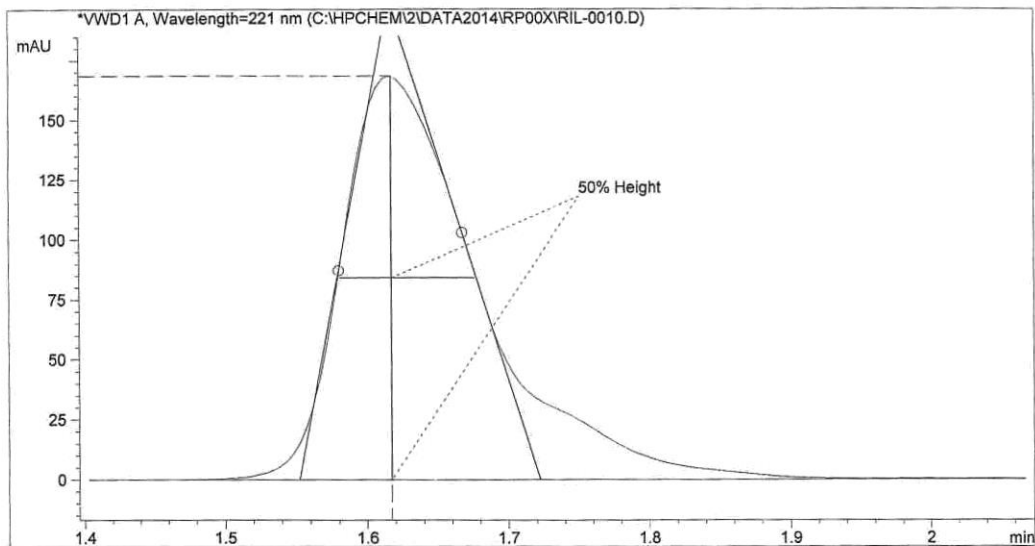
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Příloha 15: Macro Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH); metoda RP005

1

Peak Performance Evaluation



Ret. Time [min] t, t-t0:	1.617, 0
Void time (1st peak) t0:	1.617
k':	-
Height [mAU]:	168.549
Area [mAU*s]:	1148.421
Peakwidth method:	Half height
Peakwidth [min]:	0.095
Peak Start [min]:	1.46
Peak End [min]:	2.067
Skew:	1.206
Excess:	2.177
Symmetry (from integrator):	0.505
Symmetry (at 10% height):	2.47
USP Tailing:	1.781
Noise at peak baseline [mAU]:	0.0018
Signal to noise ratio:	92148.1
Integration Type:	BB
Time Increment [ms]:	291.2
Data Points:	138
0. Moment [mAU*s]:	1143.663
1. Moment [min]:	1.645
2. Moment [s^2]:	12.2
3. Moment [s^3]:	51.43
4. Moment [s^4]:	770.78
Efficiency [Plates/Column]:	1590
Efficiency [Plates/Meter]:	-
Foley Dorsey [Plates/Column]:	623
Foley Dorsey [Plates/Meter]:	-
Selectivity to prev peak:	-
Selectivity to next peak:	-
Resolution to prev peak:	-
Resolution to next peak:	-

Příloha 16: Chromatogram oplachového rozpouštědla (MeOH) metody RP006

Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0016.D

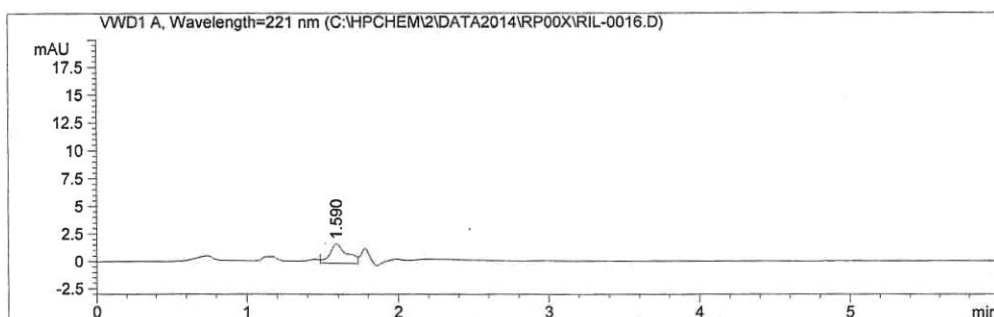
Sample Name: Blank

RILUZOL
Solvent run MeOH

```

=====
Injection Date : 18.11.14 17:54:17          Seq. Line : 3
Sample Name    : Blank                      Location  : Vial 3
Acq. Operator  : Mgr.Hanková                Inj       : 1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP006.M
Last changed   : 18.11.14 17:09:40 by Mgr.Hanková
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP006.M
Last changed   : 11.02.15 13:09:57 by Mgr.Linhartová
Riluzol in the rising solution
column:NH2
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 13:09:41
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Area %	Name
1	1.200		0.0000	0.00000	0.0000	RILUZOL
2	1.590	VV	0.1107	14.26432	100.0000	?

Totals : 14.26432

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

Příloha 17: Chromatogram Riluzolu v oplachovém rozpouštědli (MeOH); metoda RP006

Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0017.D

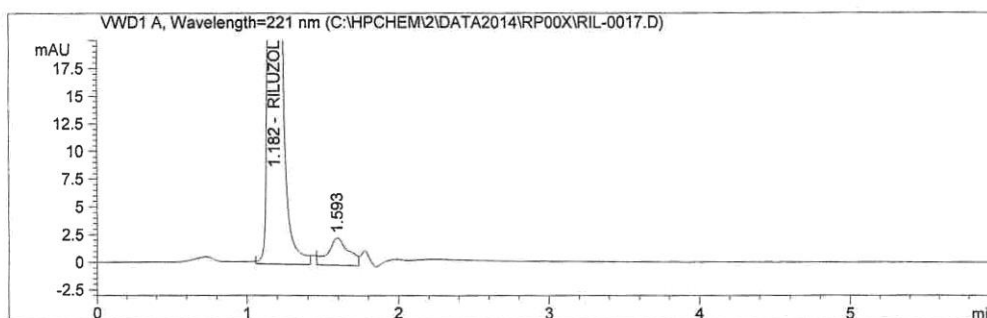
Sample Name: Standard

RILUZOL
standard 10mg/l MeOH

```

=====
Injection Date   : 18.11.14 18:01:29           Seq. Line   :    4
Sample Name     : Standard                     Location    : Vial 4
Acq. Operator   : Mgr.Hanková                 Inj         :    1
                                           Inj Volume  : 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP006.M
Last changed   : 18.11.14 17:09:40 by Mgr.Hanková
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP006.M
Last changed   : 11.02.15 13:09:57 by Mgr.Linhartová
Riluzol in the rising solution
column:NH2
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 11.02.15 13:09:41
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	1.182	BB	0.0554	726.25134	96.8734	RILUZOL
2	1.593	BV	0.1309	23.43987	3.1266	?

Totals : 749.69121

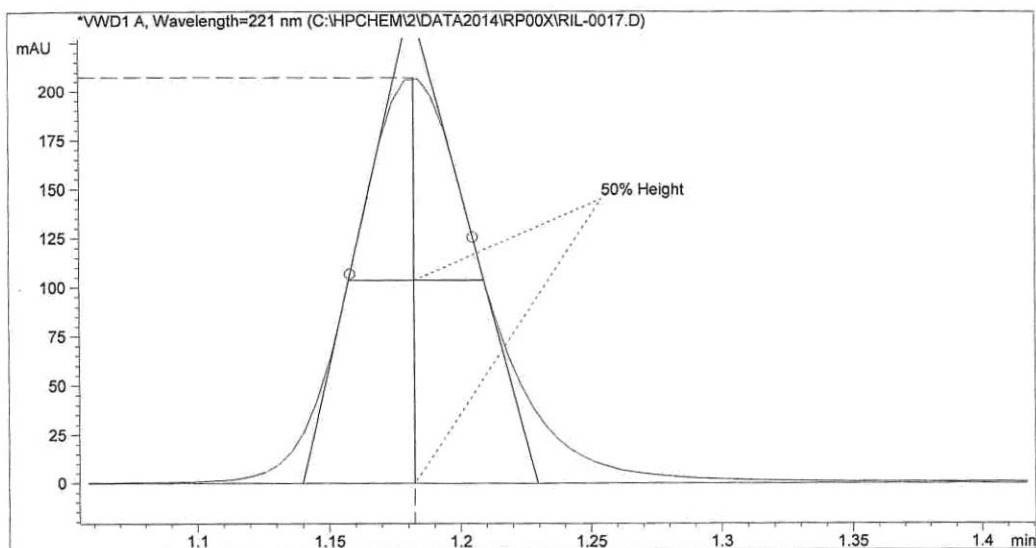
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Příloha 18: Macro Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH); metoda RP006

1

Peak Performance Evaluation



```

Ret. Time [min] t, t-t0:      1.182, 0
Void time (1st peak) t0:    1.182
k':                            -
Height [mAU]:                207.446
Area [mAU*s]:                726.251
Peakwidth method:            Half height
Peakwidth [min]:             0.051
Peak Start [min]:            1.058
Peak End [min]:              1.417
Skew:                         1.01
Excess:                       3.465
Symmetry (from integrator):  0.804
Symmetry (at 10% height):    1.262
USP Tailing:                  1.186
Noise at peak baseline [mAU]: 0.0396
Signal to noise ratio:        5226
Integration Type:             BB
Time Increment [ms]:          291.2
Data Points:                  75
0. Moment [mAU*s]:           714.455
1. Moment [min]:              1.187
2. Moment [s^2]:              2.61
3. Moment [s^3]:              4.28
4. Moment [s^4]:              44.36
Efficiency [Plates/Column]:  2890
Efficiency [Plates/Meter]:    -
Foley Dorsey [Plates/Column]: 2306
Foley Dorsey [Plates/Meter]:  -
Selectivity to prev peak:     -
Selectivity to next peak:     -
Resolution to prev peak:      -
Resolution to next peak:      2.562
    
```

Příloha 19: Naměřené koncentrace Riluzolu v reálném oplachovém rozpouštědle; RP007

Batch Report: C:\HPCHEM\2\DATA2015\RP00X\RP0XX.B

Batch Review Method:
C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

['#' ==> Run has not been reprocessed with Batch Review Method
 '*' ==> Run has been saved with batch file]

SampleInf	DataFile	Locatio	Sample	RILUZOL RT	RILUZOL Area(mAu.s)	RILUZOL Amount
Riluzol i	RIL-0014.D	Vial 2	Blank	0.000	0.00000	0.00000
Standard	RIL-0020.D	Vial 3	Standard	8.061	55.53779	5.01477e-1
Standard	RIL-0021.D	Vial 4	Standard	8.017	55.21070	4.98523e-1
sample						
RIL-0022.D	Vial 5 N. kotel	1.o	7.978	105.17734	9.49695e-1	
sample						
RIL-0023.D	Vial 5 N. kotel	1.o	7.937	105.14511	9.49404e-1	
sample						
RIL-0024.D	Vial 6 N. kotel	2.o	7.896	66.15698	5.97362e-1	
sample						
RIL-0025.D	Vial 6 N. kotel	2.o	7.855	66.78181	6.03004e-1	
sample						
RIL-0026.D	Vial 7 Filtr	1.opl.	7.810	80.72125	7.28870e-1	
sample						
RIL-0027.D	Vial 7 Filtr	1.opl.	7.769	80.63209	7.28065e-1	
sample						
RIL-0028.D	Vial 8 Filtr	2.opl.	7.725	39.80354	3.59405e-1	
sample						
RIL-0029.D	Vial 8 Filtr	2.opl.	7.684	39.71110	3.58570e-1	
sample						
RIL-0030.D	Vial 9 Kryst.	1.opl	7.645	94.99448	8.57750e-1	
sample						
RIL-0031.D	Vial 9 Kryst.	1.opl	7.602	95.06863	8.58419e-1	

*** End of Report ***

Příloha 20: Naměřené koncentrace Riluzolu v reálném oplachovém rozpouštědle; RP007

Batch Report: C:\HPCHEM\2\DATA2015\RP00X\RP0XX.B

Batch Review Method:
C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

['#' ==> Run has not been reprocessed with Batch Review Method
['*' ==> Run has been saved with batch file]

SampleInf	DataFile	Locatio	Sample	RILUZO RT	RILUZOL Area[mAu.s]	RILUZOL Amount
Standard	RIL-0032.D	Vial 3	Standard	7.565	55.75338	5.03273e-1
Standard	RIL-0033.D	Vial 4	Standard	7.519	55.02813	4.96727e-1
sample						
RIL-0034.D	Vial 10	Kryst. 2.opl	7.480	56.74345	5.12210e-1	
sample						
RIL-0035.D	Vial 10	Kryst. 2.opl	7.443	57.28165	5.17069e-1	
sample						
RIL-0036.D	Vial 11	Suš. filtr 1	7.400	10.66778	9.62957e-2	
sample						
RIL-0037.D	Vial 11	Suš. filtr 1	7.367	10.85978	9.80288e-2	
sample						
RIL-0038.D	Vial 12	Suš. filtr 2	7.331	5.89968	5.32551e-2	
sample						
RIL-0039.D	Vial 12	Suš. filtr 2	7.288	5.90406	5.32947e-2	

*** End of Report ***

Příloha 21: Naměřené koncentrace Riluzolu v reálném oplachovém rozpouštědle;
spektrfotometrická metoda

Sample Table

Software Information

Software Name: UVProbe
Version: 2.43
Mode: Security Mode

Data Information

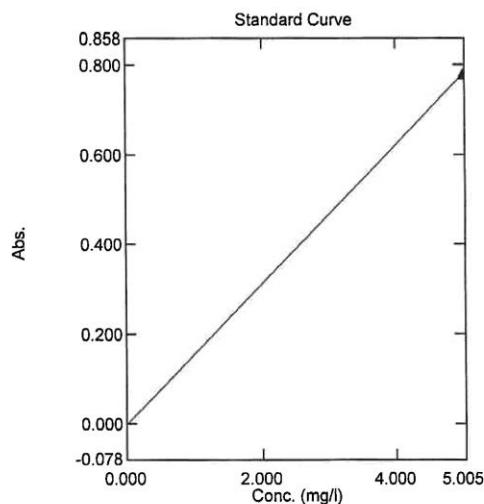
Filename: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\Riluzol
Riluzol-0060.pho

Title:

Analyst: Lenka Dieslová
Date/Time: 05.02.2015 13:44:40
Comments:

Instrument Information

Instrument Name: Instrument 1
Instrument Type: UV-1800 Series
Model (S/N): UV-1800 (A114545)



Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL223.0	Wgt.Factor	Comments
1	Standard	Standard		5.005	0.780	1.000	10.01 mg

C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\Riluzol\Riluzol-0060.pho

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL223.0	Comments
1	1	Unk-Repeat			0.152	1. opl. MeOH po Riluzolu
2	1-2	Unk-Repeat			0.152	násadový kotel
3	1-Avg	Average		0.977	0.152	Avg of preceding 2 Samples
4	2	Unk-Repeat			0.098	2. opl. MeOH po Riluzolu
5	2-2	Unk-Repeat			0.098	násadový kotel
6	2-Avg	Average		0.628	0.098	Avg of preceding 2 Samples
7	3	Unk-Repeat			0.115	1. opl.MeOH po Riluzolu
8	3-2	Unk-Repeat			0.115	filtr
9	3-Avg	Average		0.738	0.115	Avg of preceding 2 Samples
10	4	Unk-Repeat			0.064	2. opl.MeOH po Riluzolu
11	4-2	Unk-Repeat			0.064	filtr
12	4-Avg	Average		0.410	0.064	Avg of preceding 2 Samples
13						

Příloha 22: Naměřené koncentrace Riluzolu v reálném oplachovém rozpouštědle;
spektrfotometrická metoda

Sample Table

Software Information

Software Name: UVProbe
Version: 2.43
Mode: Security Mode

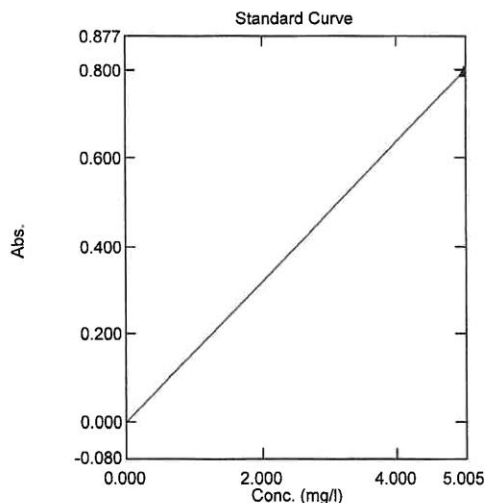
Data Information

Filename: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\Riluzol\Riluzol-0061.pho

Title:
Analyst: Lenka Dieslová
Date/Time: 05.02.2015 13:54:23
Comments:

Instrument Information

Instrument Name: Instrument 1
Instrument Type: UV-1800 Series
Model (S/N): UV-1800 (A114545)



Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL223.0	Wgt.Factor	Comments
1	Standard	Standard		5.005	0.797	1.000	10.01 mg

C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\Riluzol\Riluzol-0061.pho

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL223.0	Comments
1	5	Unk-Repeat			0.134	1. opl.MeOH po Riluzolu
2	5-2	Unk-Repeat			0.134	krystalizátor
3	5-Avg	Average		0.842	0.134	Avg of preceding 2 Samples
4	6	Unk-Repeat			0.082	2.opl. MeOH po Riluzolu
5	6-2	Unk-Repeat			0.082	krystalizátor
6	6-Avg	Average		0.517	0.082	Avg of preceding 2 Samples
7	7	Unk-Repeat			0.014	1.opl. MeOH po Riluzolu
8	7-2	Unk-Repeat			0.014	sušící filtr
9	7-Avg	Average		0.086	0.014	Avg of preceding 2 Samples
10	8	Unk-Repeat			0.013	2.opl. MeOH po Riluzolu
11	8-2	Unk-Repeat			0.013	sušící filtr
12	8-Avg	Average		0.081	0.013	Avg of preceding 2 Samples
13						

Příloha 23: Chromatogram oplachového rozpouštědla (MeOH) metody RP007 (šum baseline)

Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0020.D

Sample Name: Blank

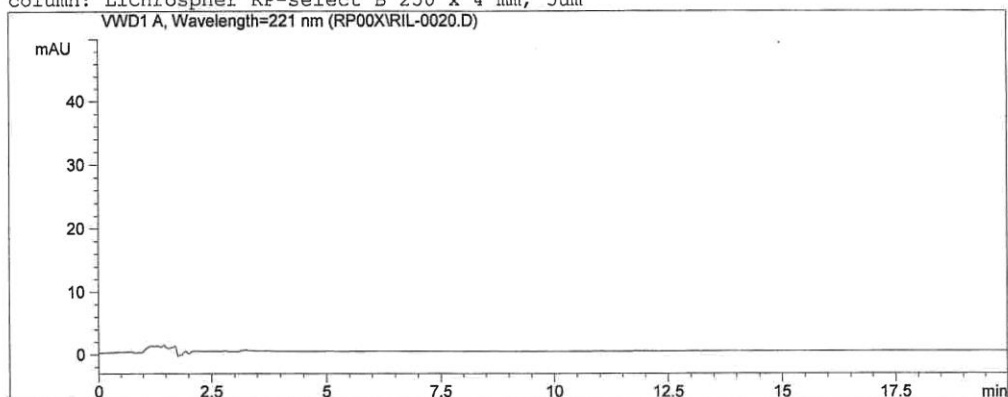
Riluzol in the rising solution
solvent run MeOH

```

=====
Injection Date   : 05.12.14 14:08:23           Seq. Line   :    1
Sample Name     : Blank                       Location    : Vial 1
Acq. Operator   : Mgr.Hanková                 Inj         :    1
                                           Inj Volume  : 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M
Last changed    : 05.12.14 11:42:16 by Mgr.Bražinová
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M
Last changed    : 06.12.14 10:57:28 by Mgr.Hanková
                                           (modified after loading)
    
```

Riluzol - assay
column: LiChrospher RP-select B 250 x 4 mm, 5µm



Area Percent Report with Performance and Noise

```

=====
Calib. Data Modified : 06.12.14 10:41:06
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm
Results obtained with enhanced integrator!

Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)	[mAU]	[mAU /h]
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU /h]
5.000 9.000	1.851e-2	2.187e-2	3.324e-3	1.515e-2	1.078e-1

RetTime	k'	Area	Height	Symm.	Width	Plates	Resol	Signal
[min]		mAU *s	[mAU]		[min]			ution /Noise
-	-	0.00000	0.00000	0.00	-	-	-	-

*** End of Report ***

Příloha 24: Chromatogram standardu Riluzolu v roztoku A I. o conc. 1mg/L v oplachovém rozpouštědle (MeOH); metoda RP007

Data File C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X\RIL-0051.D

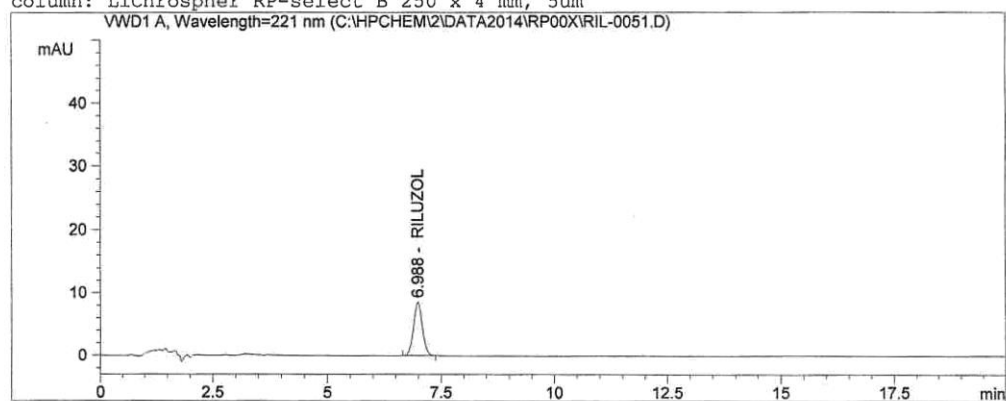
Sample Name: Roztok A I.

Brimonidin tartarat v.p. - purity
Riluzol conc. 1mg/l

```
=====
Injection Date   : 06.12.14 1:05:46           Seq. Line :   29
Sample Name      : Roztok A I.                Location  : Vial 29
Acq. Operator    : Mgr.Hanková                 Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl

Acq. Method      : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M
Last changed     : 05.12.14 11:42:16 by Mgr.Bražinová
Analysis Method  : C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M
Last changed     : 10.04.15 8:34:25 by Mgr. Vyhlidal
                  (modified after loading)
=====
```

Riluzol - assay
column: LiChrospher RP-select B 250 x 4 mm, 5µm



=====
Area Percent Report
=====

```
Sorted By          :      Signal
Calib. Data Modified : 10.04.15 8:33:54
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=221 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Area %	Name
1	6.988	BB	0.2040	113.99863	100.0000	RILUZOL

Totals : 113.99863

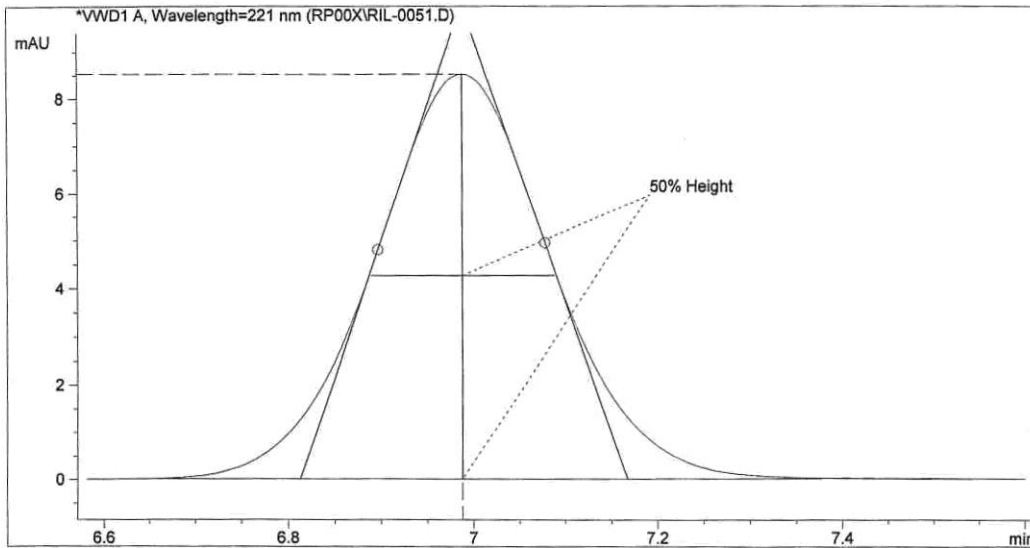
Results obtained with enhanced integrator!

=====
*** End of Report ***

Příloha 25: Macro standardu Riluzolu v roztoku A I.; metoda RP007

1

Peak Performance Evaluation



Ret. Time [min] t, t-t0:	6.988, 0
Void time (1st peak) t0:	6.988
k':	-
Height [mAU]:	8.53
Area [mAU*s]:	113.998
Peakwidth method:	Half height
Peakwidth [min]:	0.198
Peak Start [min]:	6.658
Peak End [min]:	7.377
Skew:	0.1
Excess:	0.146
Symmetry (from integrator):	0.963
Symmetry (at 10% height):	1.032
USP Tailing:	1.031
Noise at peak baseline [mAU]:	0.0011
Signal to noise ratio:	7721
Integration Type:	BB
Time Increment [ms]:	291.2
Data Points:	211
0. Moment [mAU*s]:	113.541
1. Moment [min]:	6.99
2. Moment [s^2]:	30.69
3. Moment [s^3]:	17.05
4. Moment [s^4]:	2963.96
Efficiency [Plates/Column]:	6832
Efficiency [Plates/Meter]:	-
Foley Dorsey [Plates/Column]:	5771
Foley Dorsey [Plates/Meter]:	-
Selectivity to prev peak:	-
Selectivity to next peak:	-
Resolution to prev peak:	-
Resolution to next peak:	-

Příloha 26: Statistické parametry roztoku C I.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

S t a t i s t i c R e p o r t

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 2	1	05.12.14 15:33:04	RIL-0024.D	Roztok C I-I
2	Vial 3	1	05.12.14 15:54:17	RIL-0025.D	Roztok C I-II
3	Vial 4	1	05.12.14 16:15:30	RIL-0026.D	Roztok C I-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BP	7.511	5.54383	5.54383	3.84721e-1	0.2205	1.02
2	BP	7.488	5.39257	5.39257	3.68806e-1	0.2186	1.03
3	BP	7.470	5.49639	5.49639	3.89368e-1	0.2171	0.96
Mean:		7.490	5.47760	5.47760	3.80965e-1	0.2188	1.00
S.D.:		0.020	7.73619e-2	7.73619e-2	1.07834e-2	1.72e-3	0.03
RSD :		0.273	1.41233	1.41233	2.83056	0.7850	3.45
95% CI:		0.051	1.92178e-1	1.92178e-1	2.67875e-2	4.27e-3	0.09

Příloha 27: Statistické parametry roztoku C II.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

S t a t i s t i c R e p o r t

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 5	1	05.12.14 16:36:42	RIL-0027.D	Roztok C II-I
2	Vial 6	1	05.12.14 16:57:57	RIL-0028.D	Roztok C II-II
3	Vial 7	1	05.12.14 17:19:10	RIL-0029.D	Roztok C II-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.454	11.40671	11.40671	7.84226e-1	0.2221	1.06
2	BB	7.427	11.50796	11.50796	7.93117e-1	0.2188	1.05
3	BB	7.408	11.64691	11.64691	8.44059e-1	0.2061	0.99
Mean:		7.430	11.52053	11.52053	8.07134e-1	0.2157	1.03
S.D.:		0.023	1.20591e-1	1.20591e-1	3.22855e-2	8.44e-3	0.04
RSD :		0.311	1.04675	1.04675	4.00002	3.9119	3.84
95% CI:		0.057	2.99565e-1	2.99565e-1	8.02016e-2	0.0210	0.10

Příloha 28: Statistické parametry roztoku C III.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

Statistic Report

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location #	Inj. #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 8	1	05.12.14 17:40:22	RIL-0030.D	Roztok C III-I
2	Vial 9	1	05.12.14 18:01:33	RIL-0031.D	Roztok C III-II
3	Vial 10	1	05.12.14 18:22:47	RIL-0032.D	Roztok C III-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.386	17.43112	17.43112	1.22418	0.2127	1.08
2	BP	7.367	17.45566	17.45566	1.22731	0.2140	1.08
3	BP	7.348	17.46508	17.46508	1.23057	0.2165	1.07
Mean:		7.367	17.45062	17.45062	1.22735	0.2144	1.08
S.D.:		0.019	1.75309e-2	1.75309e-2	3.19334e-3	1.95e-3	3e-3
RSD :		0.258	1.00460e-1	1.00460e-1	2.60181e-1	0.9095	0.27
95% CI:		0.047	4.35490e-2	4.35490e-2	7.93270e-3	4.84e-3	7e-3

Příloha 29: Statistické parametry roztoku C IV.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

Statistic Report

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 11	1	05.12.14 18:43:59	RIL-0033.D	Roztok C IV-I
2	Vial 12	1	05.12.14 19:05:08	RIL-0034.D	Roztok C IV-II
3	Vial 13	1	05.12.14 19:26:23	RIL-0035.D	Roztok C IV-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.329	23.58347	23.58347	1.74280	0.2059	0.99
2	BB	7.308	23.45609	23.45609	1.73648	0.2056	1.00
3	BB	7.288	23.74716	23.74716	1.74648	0.2096	0.98
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Mean:		7.309	23.59557	23.59557	1.74192	0.2071	0.99
S.D.:		0.020	1.45912e-1	1.45912e-1	5.06257e-3	2.21e-3	8e-3
RSD :		0.279	6.18386e-1	6.18386e-1	2.90631e-1	1.0654	0.79
95% CI:		0.051	3.62465e-1	3.62465e-1	1.25761e-2	5.48e-3	0.02

Příloha 30: Statistické parametry roztoku C V.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

Statistic Report

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location #	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 14	1	05.12.14 19:47:35	RIL-0036.D	Roztok C V-I
2	Vial 15	1	05.12.14 20:08:50	RIL-0037.D	Roztok C V-II
3	Vial 16	1	05.12.14 20:30:01	RIL-0038.D	Roztok C V-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.268	29.87462	29.87462	2.20799	0.2074	0.98
2	BB	7.247	29.80109	29.80109	2.20749	0.2055	0.99
3	BB	7.230	29.88078	29.88078	2.21308	0.2056	0.99
Mean:		7.249	29.85216	29.85216	2.20952	0.2062	0.98
S.D.:		0.019	4.43359e-2	4.43359e-2	3.09400e-3	1.04e-3	4e-3
RSD :		0.266	1.48518e-1	1.48518e-1	1.40031e-1	0.5035	0.44
95% CI:		0.048	1.10137e-1	1.10137e-1	7.68592e-3	2.58e-3	0.01

Příloha 31: Statistické parametry roztoku C VI.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

S t a t i s t i c R e p o r t

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 17	1	05.12.14 20:51:15	RIL-0039.D	Rožtok C VI-I
2	Vial 18	1	05.12.14 21:12:28	RIL-0040.D	Rožtok C VI-II
3	Vial 19	1	05.12.14 21:33:42	RIL-0041.D	Rožtok C VI-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.213	35.40527	35.40527	2.52633	0.2086	1.06
2	BB	7.189	35.90598	35.90598	2.65945	0.2056	0.98
3	BB	7.170	35.46912	35.46912	2.50763	0.2116	1.09
Mean:		7.191	35.59346	35.59346	2.56447	0.2086	1.05
S.D.:		0.022	2.72529e-1	2.72529e-1	8.27861e-2	3.02e-3	0.05
RSD :		0.302	7.65671e-1	7.65671e-1	3.22819	1.4497	5.18
95% CI:		0.054	6.76999e-1	6.76999e-1	2.05652e-1	7.51e-3	0.13

Příloha 32: Statistické parametry roztoku C VII.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

Statistic Report

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 20	1	05.12.14 21:54:54	RIL-0042.D	Roztok C VII-I
2	Vial 21	1	05.12.14 22:16:10	RIL-0043.D	Roztok C VII-II
3	Vial 22	1	05.12.14 22:37:21	RIL-0044.D	Roztok C VII-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.152	41.53467	41.53467	3.08372	0.2052	0.98
2	BB	7.132	41.26559	41.26559	2.93380	0.2107	1.07
3	BB	7.112	41.60680	41.60680	3.09618	0.2048	0.97
Mean:		7.132	41.46902	41.46902	3.03790	0.2069	1.01
S.D.:		0.020	1.79832e-1	1.79832e-1	9.03694e-2	3.29e-3	0.06
RSD:		0.278	4.33654e-1	4.33654e-1	2.97473	1.5886	5.49
95% CI:		0.049	4.46727e-1	4.46727e-1	2.24490e-1	8.16e-3	0.14

Příloha 33: Statistické parametry roztoku C VIII.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

Statistické Report

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 23	1	05.12.14 22:58:32	RIL-0045.D	Roztok C VIII-I
2	Vial 24	1	05.12.14 23:19:46	RIL-0046.D	Roztok C VIII-II
3	Vial 25	1	05.12.14 23:40:58	RIL-0047.D	Roztok C VIII-II

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.096	47.18819	47.18819	3.51578	0.2046	0.98
2	BB	7.077	47.28970	47.28970	3.52647	0.2045	0.98
3	BB	7.058	46.52568	46.52568	3.30819	0.2107	1.08
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Mean:		7.077	47.00119	47.00119	3.45015	0.2066	1.01
S.D.:		0.019	4.14922e-1	4.14922e-1	1.23056e-1	3.52e-3	0.06
RSD :		0.270	8.82791e-1	8.82791e-1	3.56670	1.7059	6.01
95% CI:		0.047	1.03072	1.03072	3.05689e-1	8.75e-3	0.15

Příloha 34: Statistické parametry roztoku C IX.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

Statistic Report

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 26	1	06.12.14 0:02:09	RIL-0048.D	Roztok C IX-I
2	Vial 27	1	06.12.14 0:23:21	RIL-0049.D	Roztok C IX-II
3	Vial 28	1	06.12.14 0:44:35	RIL-0050.D	Roztok C IX-III

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	7.042	53.95309	53.95309	4.02259	0.2045	0.97
2	BB	7.024	52.97912	52.97912	3.77566	0.2118	1.07
3	BB	7.005	53.33276	53.33276	3.99517	0.2038	0.98
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Mean:		7.024	53.42166	53.42166	3.93114	0.2067	1.01
S.D.:		0.018	4.93032e-1	4.93032e-1	1.35347e-1	4.40e-3	0.05
RSD :		0.261	9.22906e-1	9.22906e-1	3.44294	2.1285	5.34
95% CI:		0.045	1.22476	1.22476	3.36220e-1	0.0109	0.13

Příloha 35: Statistické parametry roztoku A I.; metoda RP007

Sequence File C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S

Statistic Report

Sequence table: C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\RP00X.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\2\DATA2014\RP00X
 Operator: Mgr.Hanková

Method file name: C:\HPCHEM\2\METHODS\RP007.M

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 29	1	06.12.14 1:05:46	RIL-0051.D	Roztok A I.
2	Vial 30	1	06.12.14 1:27:01	RIL-0052.D	Roztok A II.
3	Vial 31	1	06.12.14 1:48:15	RIL-0053.D	Roztok A III.
4	Vial 32	1	06.12.14 2:09:27	RIL-0054.D	Roztok A IV.
5	Vial 33	1	06.12.14 2:30:39	RIL-0055.D	Roztok A V.

Compound: RILUZOL (Signal: VWD1 A, Wavelength=221 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	6.988	113.99863	113.99863	8.53077	0.2040	0.96
2	BB	6.976	112.98154	112.98154	8.09706	0.2094	1.06
3	BB	6.959	112.74841	112.74841	8.09220	0.2091	1.06
4	BB	6.942	114.36063	114.36063	8.60597	0.2016	0.96
5	BB	6.928	114.45120	114.45120	8.59869	0.2019	0.96
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Mean:		6.958	113.70808	113.70808	8.38494	0.2052	1.00
S.D.:		0.025	7.92356e-1	7.92356e-1	2.66636e-1	3.82e-3	0.05
RSD :		0.352	6.96833e-1	6.96833e-1	3.17995	1.8622	5.35
95% CI:		0.030	9.83839e-1	9.83839e-1	3.31073e-1	4.74e-3	0.07

	Číslo validační zprávy: Strana číslo: 1 Počet stran: 22 Počet příloh:
--	--

Validační zpráva

Validation Report

Stanovení obsahu Riluzolu v oplachovém

rozpouštědle (MeOH)

Determination of Riluzole in the rinsing solution (MeOH)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
High Performance Liquid Chromatography

Vypracoval: Mgr. Lucie Hanková Podpis: Datum:	Schválil: Podpis: Datum:

	Číslo validační zprávy : 224/14 Strana číslo : 2 Počet stran : 22 Počet příloh :
--	---

Obsah:

1. Úvod (Preface)	3
2. Použité chemikálie (Chemicals).....	3
3. Zařízení (Equipment)	3
4. Příprava roztoků (Sample preparation)	4
5. Metoda (Method).....	6
6. Validace metody obsahu (Method validation - assay)	7
6.1. Specifičnost (Specificity)	7
6.2. Přesnost (Precision).....	7
6.3. Linearita (Linearity)	13
6.6. LOD a LOQ (Limit of quantification and detection)	17
6.7. Rozsah (Range)	22
7. Závěr (Conclusion).....	22

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 3
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

1. Úvod (Preface)

Validovaná HPLC metoda má být používána na stanovení obsahu substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle. Cílem validace bylo zjistit, zda je limit kvantifikace metody menší než stanovená limitní koncentrace substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle a zda je metoda dostatečně přesná, specifická, správná a zda poskytuje lineární závislost.

2. Použité chemikálie (Chemicals)

Reagencie: Acetonitril g.g., LiChrosolv, Merck, 1.00030
Voda, LiChrosolv, Merck, 1.15333
Methanol g.g., LiChrosolv, Merck, 1.06007

Substance: Riluzol - pracovní standard

3. Zařízení (Equipment)

Sestava kapalinového chromatografu AGILENT 1100 (metrologické číslo LX3) s vysokotlakým kvartérním čerpadlem a WVD detektorem. Integrátor Agilent Chemstation.

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 4
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

4. Příprava roztoků (Sample preparation)

Rozpouštědlo: MeOH g.g.

Roztok A (1 mg/L):

Bylo naváženo přesně 5,0 mg pracovního standardu Riluzolu do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěno v MeOH za použití ultrazvuku a doplněno rozpouštědlem po rysku (= zásobní roztok). Ze zásobního roztoku bylo odpipetováno 5 ml do 50 ml odměrné baňky a doplněno rozpouštědlem po rysku. Následně bylo opět odpipetováno 5 ml do 50 ml odměrné baňky a doplněno rozpouštědlem po rysku (= pracovní roztok). Pracovní roztok byl ze zásobního připraven 5-krát (5 navážek 5,0 mg).

Roztok B (10 mg/L):

Roztoky byly připraveny 9-krát navážením přesně 5,0 mg pracovního standardu Riluzolu do 50 ml odměrné baňky a doplněním rozpouštědlem po rysku (= zásobní roztok). Z těchto zásobních roztoků bylo dále odpipetováno 5 ml do 50 ml odměrné baňky a doplněno rozpouštědlem po rysku (= pracovní roztok).

Pracovní roztoky B byly dále použity na přípravu limitních roztoků C.

Roztoky C

Limitní roztoky určené na stanovení přesnosti, linearity, LOD a LOQ C_{I-IX} . Z roztoku **B_I** byl 3-krát připraven roztok $C_{I(1-3)}$ odpipetováním 250 μ l do 50 ml odměrky, z roztoku **B_{II}** byl 3-krát připraven roztok $C_{II(1-3)}$ odpipetováním 500 μ l do 50 ml odměrky, z roztoku **B_{III}** byl 3-krát připraven roztok $C_{III(1-3)}$ odpipetováním 750 μ l do 50 ml odměrky, z roztoku **B_{IV}** byl 3-krát připraven roztok $C_{IV(1-3)}$ odpipetováním 1000 μ l do 50 ml odměrky, z roztoku **B_V** byl 3-krát připraven roztok $C_{V(1-3)}$ odpipetováním 1250 μ l do 50 ml odměrky, z roztoku **B_{VI}** byl 3-krát připraven $C_{VI(1-3)}$ odpipetováním 1500 μ l do 50 ml odměrky, z roztoku **B_{VII}** byl 3-krát připraven roztok $C_{VII(1-3)}$ odpipetováním 1750 μ l do 50 ml odměrky, z roztoku **B_{VIII}** byl 3-krát připraven roztok $C_{VIII(1-3)}$ odpipetováním 2000 μ l do 50 ml odměrky a 3-krát $C_{IX(1-3)}$ odpipetováním 2250 μ l do 50 ml odměrky a doplněním rozpouštědlem po rysku.

	Číslo validační zprávy : 224/14 Strana číslo : 5 Počet stran : 22 Počet příloh :
--	---

Roztok D:

Bylo naváženo přesně 5,0 mg pracovního standardu Riluzolu do 50 ml odměrky, rozpuštěno v MeOH za použití ultrazvuku a doplněno rozpouštědlem po rysku. Dále bylo z tohoto roztoku odpipetováno 5 ml do 50 ml odměrné baňky a doplněno rozpouštědlem po rysku (= zásobní roztok). Ze zásobního roztoku bylo odpipetováno 300 μ l do 100ml odměrné baňky a doplněno rozpouštědlem po rysku (= pracovní roztok). Pracovní roztok byl připraven 6-krát.

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 6
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

5. Metoda (Method)

- KOLONA: LiChrospher 60, 250 x 4.0 mm, 5 µm
- DÉLKA ANALÝZY: 20 min
- PRŮTOK: 1,5 ml/min
- NÁSTRÍK: 20 µl
- TEPLOTA KOLONY: 25 °C
- UV-DETEKCE: 221 nm
- ROZPOUŠTĚDLO: Methanol g.g.
- MOBILNÍ FÁZE: ACN g.g., H₂O v poměru 45 : 55
- METODA: C:/HPCHEM/2/METHODS/RP007.M

	Číslo validační zprávy : 224/14 Strana číslo : 7 Počet stran : 22 Počet příloh :
--	---

6. Validace metody obsahu (Method validation - assay)

6.1. Specifičnost (Specificity)

Specifičnost byla zjišťována analýzou roztoku „A_(I-I)“ (RIL-0051.D). Případný vliv rozpouštědla je eliminován nástřikem slepého vzorku (RIL-0020.D). Retenční čas pracovního standardu Riluzolu byl v průběhu celé validační sekvence stabilní a je dostatečně odlišný od mrtvého času. V tabulce č. I jsou uvedeny charakteristiky metody.

Tabulka č. I

	T _R (min)	USP Tailing	Počet teor. pater	Plocha Píku (mAU·s)	Symetrie píku v 10%	Výška píku (mAU)
Riluzol	7,0	1,0	6832	114,00	1,0	58,0

6.2. Přesnost (Precision)

6.2.1 Opakovatelnost (Repeatability)

Přesnost byla vyjádřena jako opakovatelnost analýzou 5-ti pracovních roztoků A_(I-V). Přesnost byla také vyhodnocena z pracovních roztoků C_I až C_{IX}. Plochy byly statisticky vyhodnoceny a jsou uvedeny v tabulkách č. II – XI.

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 8
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

Tabulka č. II Opakovatelnost pro roztoky A_(I-V)

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0051.D	113,999	6,988
2	RIL-0052.D	112,982	6,976
3	RIL-0053.D	112,748	6,959
4	RIL-0054.D	114,361	6,942
5	RIL-0055.D	114,451	6,928
Průměr		113,708	6,958
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,792	0,025
R.S.D.		0,697	0,352
95% CI		0,984	0,030

Tabulka č. III Opakovatelnost pro roztoky C_I

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0024.D	5,544	7,511
2	RIL-0025.D	5,393	7,488
3	RIL-0026.D	5,496	7,470
Průměr		5,478	7,490
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,077	0,020
R.S.D.		1,412	0,273
95% CI		0,192	0,051

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 9
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

Tabulka č. IV Opakovatelnost pro roztoky C_{II}

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0027.D	11,407	7,454
2	RIL-0028.D	11,508	7,427
3	RIL-0029.D	11,647	7,408
Průměr		11,521	7,430
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,121	0,023
R.S.D.		1,047	0,311
95% CI		0,300	0,057

Tabulka č. V Opakovatelnost pro roztoky C_{III}

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0030.D	17,431	7,386
2	RIL-0031.D	17,456	7,367
3	RIL-0032.D	17,465	7,348
Průměr		17,451	7,367
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,018	0,019
R.S.D.		0,100	0,258
95% CI		0,044	0,047

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 10
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

Tabulka č. VI Opakovatelnost pro roztoky C_{IV}

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0033.D	23,583	7,329
2	RIL-0034.D	23,456	7,308
3	RIL-0035.D	23,747	7,288
Průměr		23,596	7,309
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,146	0,020
R.S.D.		0,618	0,279
95% CI		0,362	0,051

Tabulka č. VII Opakovatelnost pro roztoky C_V

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0036.D	29,875	7,268
2	RIL-0037.D	29,801	7,247
3	RIL-0038.D	29,881	7,230
Průměr		29,852	7,249
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,044	0,019
R.S.D.		0,149	0,266
95% CI		0,110	0,048

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 11
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

Tabulka č. VIII Opakovatelnost pro roztoky C_{VI}

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0039.D	35,405	7,213
2	RIL-0040.D	35,906	7,189
3	RIL-0041.D	35,469	7,170
Průměr		35,593	7,191
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,273	0,022
R.S.D.		0,766	0,302
95% CI		0,677	0,054

Tabulka č. IX Opakovatelnost pro roztoky C_{VII}

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0042.D	41,535	7,152
2	RIL-0043.D	41,266	7,132
3	RIL-0044.D	41,607	7,112
Průměr		41,469	7,132
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,180	0,020
R.S.D.		0,434	0,278
95% CI		0,447	0,049

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 12
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

Tabulka č. X Opakovatelnost pro roztoky C_{VIII}

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0045.D	47,188	7,096
2	RIL-0046.D	47,290	7,077
3	RIL-0047.D	46,526	7,058
Průměr		47,001	7,077
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,415	0,019
R.S.D.		0,883	0,270
95% CI		1,031	0,047

Tabulka č. XI Opakovatelnost pro roztoky C_{IX}

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)	T _R Riluzolu (min)
1	RIL-0048.D	53,953	7,042
2	RIL-0049.D	52,979	7,024
3	RIL-0050.D	53,333	7,005
Průměr		53,422	7,024
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,493	0,018
R.S.D.		0,923	0,261
95% CI		1,225	0,045

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 13
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

6.3. Linearita (Linearity)

Linearita byla sledována na devíti koncentračních hladinách pracovních roztoků C a na jedné koncentrační hladině roztoku A v rozmezí koncentrace substance Riluzolu 0,05mg/L – 1mg/L (pracovní roztoky C_I – C_{IX}; A). Každá koncentrace z řady C roztoků byla dávkována třikrát, A roztok 5 krát a výsledek byl zprůměrován. (Tabulka č. XII) Linearita byla vyhodnocena lineární regresní analýzou jako závislost:

$$Y (\text{plocha[mAU.s]}) = f(X (\text{koncentrace c[\%]}))$$

$$Y = b * X + a, \text{ kde parametr } a \text{ je úsek (posun) a parametr } b \text{ je směrnice.}$$

Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního R a QC koeficientu.

Pro korelační R platí:
$$R = \frac{s_{xy}}{s_x s_y},$$

kde s_x je směrodatná odchylka proměnné X, s_y je směrodatná odchylka proměnné Y a s_{xy} je střední hodnota proměnných x a y.

Pro QC koeficient platí:
$$QC = 100 \cdot \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{y_i - Y_i}{y} \right)^2}{n - 1}},$$

Kde Y_i jsou predikované hodnoty y_i , tj. hodnoty vypočtené z regresní rovnice.

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 14
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

Tabulka č. XII Závislost plochy píku substance Riluzolu na koncentraci

	Obsah (mg/L)	Roztok	Chromatogram	Plocha Riluzolu (mAU.s)	Průměr ploch Riluzolu
1	0,05	C _I	RIL-0024.D	5,544	5,478
2	0,05	C _I	RIL-0025.D	5,393	
3	0,05	C _I	RIL-0026.D	5,496	
4	0,10	C _{II}	RIL-0027.D	11,407	11,521
5	0,10	C _{II}	RIL-0028.D	11,508	
6	0,10	C _{II}	RIL-0029.D	11,647	
10	0,15	C _{III}	RIL-0030.D	17,431	17,451
11	0,15	C _{III}	RIL-0031.D	17,456	
12	0,15	C _{III}	RIL-0032.D	17,465	
13	0,20	C _{IV}	RIL-0033.D	23,583	23,596
14	0,20	C _{IV}	RIL-0034.D	23,456	
15	0,20	C _{IV}	RIL-0035.D	23,747	
16	0,25	C _V	RIL-0036.D	29,875	29,852
17	0,25	C _V	RIL-0037.D	29,801	
18	0,25	C _V	RIL-0038.D	29,881	
19	0,30	C _{VI}	RIL-0039.D	35,405	35,593
20	0,30	C _{VI}	RIL-0040.D	35,906	
21	0,30	C _{VI}	RIL-0041.D	35,469	

	<p>Číslo validační zprávy : 224/14</p> <p>Strana číslo : 15</p> <p>Počet stran : 22</p> <p>Počet příloh :</p>
--	---

	Obsah (mg/L)	Roztok	Chromatogram	Plocha Riluzolu (mAU.s)	Průměr ploch Riluzolu
22	0,35	C _{VII}	RIL-0042.D	41,535	41,469
23	0,35	C _{VII}	RIL-0043.D	41,266	
24	0,35	C _{VII}	RIL-0044.D	41,607	
25	0,40	C _{VIII}	RIL-0045.D	47,188	47,001
26	0,40	C _{VIII}	RIL-0046.D	47,290	
27	0,40	C _{VIII}	RIL-0047.D	46,526	
28	0,45	C _{IX}	RIL-0048.D	53,953	53,422
29	0,45	C _{IX}	RIL-0049.D	52,979	
30	0,45	C _{IX}	RIL-0050.D	53,333	
31	1,00	A _I	RIL-0051.D	113,999	113,708
32	1,00	A _{II}	RIL-0052.D	112,982	
33	1,00	A _{III}	RIL-0053.D	112,748	
34	1,00	A _{IV}	RIL-0054.D	114,361	
35	1,00	A _V	RIL-0055.D	114,451	

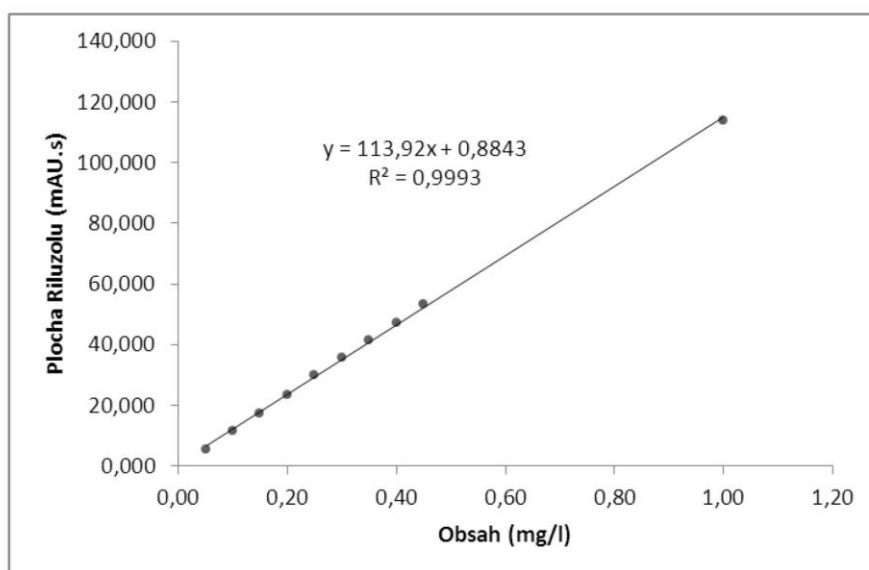
Číslo validační zprávy : 224/14

Strana číslo : 16

Počet stran : 22

Počet příloh :

Graf č. 1 Závislost plochy píku substance Riluzolu na koncentraci



Hodnoty lineární kalibrační funkce pro substanci Riluzolu:

R = 0,9993 Limit je $\leq 0,999$

QC = 2,68 % Limit je $\geq 3,0$ %

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 17
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

6.6 LOD a LOQ (Limit of quantification and detection)

Tabulka č. XIII závislost výšky píku na koncentraci

	Obsah (mg/L)	Roztok	Chromatogram	Výška Riluzolu (mAU.s)	Průměr výšky Riluzolu
1	0,05	C _{I-I}	RIL-0024.D	0,385	0,381
2	0,05	C _{I-II}	RIL-0025.D	0,369	
3	0,05	C _{I-III}	RIL-0026.D	0,389	
4	0,10	C _{II-I}	RIL-0027.D	0,784	0,807
5	0,10	C _{II-II}	RIL-0028.D	0,793	
6	0,10	C _{II-III}	RIL-0029.D	0,844	
7	0,15	C _{III-I}	RIL-0030.D	1,224	1,227
8	0,15	C _{III-II}	RIL-0031.D	1,227	
9	0,15	C _{III-III}	RIL-0032.D	1,231	
10	0,20	C _{IV-I}	RIL-0033.D	1,743	1,742
11	0,20	C _{IV-II}	RIL-0034.D	1,736	
12	0,20	C _{IV-III}	RIL-0035.D	1,746	
13	0,25	C _{V-I}	RIL-0036.D	2,208	2,210
14	0,25	C _{V-II}	RIL-0037.D	2,208	
15	0,25	C _{V-III}	RIL-0038.D	2,213	
16	0,30	C _{VI-I}	RIL-0039.D	2,526	2,564
17	0,30	C _{VI-II}	RIL-0040.D	2,659	
18	0,30	C _{VI-III}	RIL-0041.D	2,508	

	Číslo validační zprávy : 224/14 Strana číslo : 18 Počet stran : 22 Počet příloh :
--	--

	Obsah (mg/l)	Roztok	Chromatogram	Výška Riluzolu (mAU.s)	Průměr výšky Riluzolu
19	0,35	C _{VII-I}	RIL-0042.D	3,084	3,038
20	0,35	C _{VII-II}	RIL-0043.D	2,934	
21	0,35	C _{VII-III}	RIL-0044.D	3,096	
22	0,40	C _{VIII-I}	RIL-0045.D	3,516	3,450
23	0,40	C _{VIII-II}	RIL-0046.D	3,526	
24	0,40	C _{VIII-III}	RIL-0047.D	3,308	
25	0,45	C _{IX-I}	RIL-0048.D	4,023	3,931
26	0,45	C _{IX-II}	RIL-0049.D	3,776	
27	0,45	C _{IX-III}	RIL-0050.D	3,995	
28	1,00	A _I	RIL-0051.D	8,531	8.385
29	1,00	A _I	RIL-0052.D	8,097	
30	1,00	A _I	RIL-0053.D	8,092	
31	1,00	A _I	RIL-0054.D	8,606	
32	1,00	A _I	RIL-0055.D	8,599	

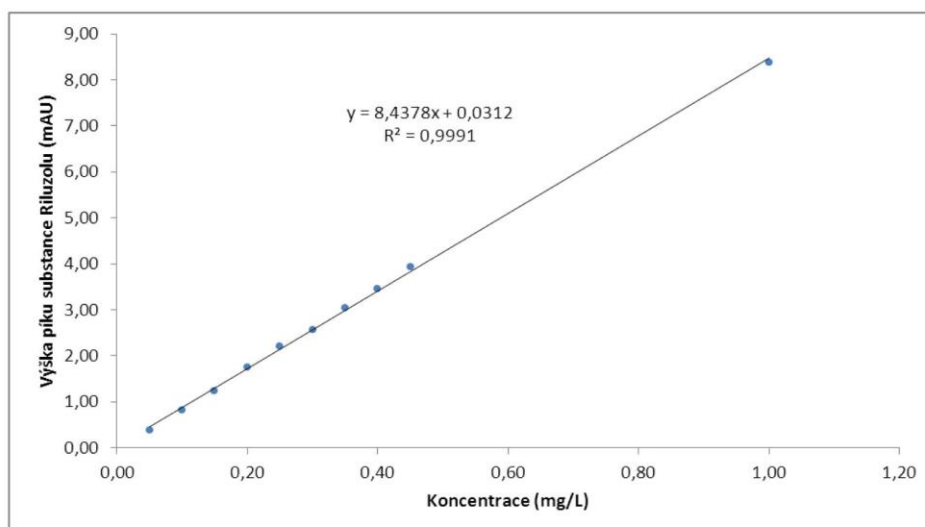
Číslo validační zprávy : 224/14

Strana číslo : 19

Počet stran : 22

Počet příloh :

Graf č. 2 Závislost výšky píku substance Riluzolu na koncentraci



Rovnice lineární kalibrační funkce Riluzolu: $Y = 8,4378x + 0,0312$

Z naměřených dat byla vyhodnocena závislost: $Y(\text{výška}) = f(x(\text{koncentrace}))$
 $Y = a - b \cdot X$

Pro stanovení LOD a LOQ byly použity výpočty ze šumu, kdy platí:

$$\text{LOD} = 3 \cdot \text{noise} / b$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{noise} / b, \quad \text{kde } a \text{ je posun a } b \text{ je směrnice kalibr. křivky}$$

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 20
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

6.6.1 Limit detekce (Limit of detection)

Z chromatogramu slepého vzorku (RIL-0020.D) byla metodou „peak to peak“ nalezena hodnota šumu pro substanci Riluzol 0,0219 mAU. Trojnásobek této hodnoty je 0,0657. Z kalibrační přímky byla získána hodnota směrnice $b = 8,4378$. Minimální detekovatelná koncentrace byla vypočtena z těchto údajů na 0,0115 mg/L.

$$\text{LOD}_{\text{Riluzolu}} = 0,0115 \text{ mg/L}$$

6.6.2 Limit kvantifikace (Limit of quantifikation)

Z chromatogramu slepého vzorku (RIL-0020.D) byla metodou „peak to peak“ nalezena hodnota šumu pro substanci Riluzol 0,0219 mAU. Desetinásobek této hodnoty je 0,219. Z kalibrační přímky byla získána hodnota směrnice $b = 8,4378$. Minimální kvantifikovatelná koncentrace byla vypočtena z těchto údajů na 0,0297 mg/L.

$$\text{LOQ}_{\text{Riluzolu}} = 0,0297 \text{ mg/L}$$

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 21
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

6.6.3 Ověření LOQ (Verification of limit quantification)

Hodnota limitu kvantifikace byla ověřena hodnotou RSD ploch substance Riluzolu z roztoků **D**. Nalezené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. XIV

Tabulka č. XIV Ověření LOQ pro substanci Riluzol – roztok D

	Označení Chromatogramu	Plocha Riluzolu (mAU.s)
1	RIL-0007.D	3,334
2	RIL-0008.D	3,193
3	RIL-0009.D	3,307
4	RIL-0010.D	3,302
5	RIL-0011.D	3,268
6	RIL-0012.D	3,263
Průměr		3,278
Směrodatná odchylka (S.D.)		0,049
R.S.D.		1,506
95% CI		0,052

	Číslo validační zprávy : 224/14
	Strana číslo : 22
	Počet stran : 22
	Počet příloh :

6.7 Rozsah (Range)

Linearita a přesnost byla testována na koncentračních hladinách 0,05mg/L, 0,10mg/L, 0,15mg/L, 0,20mg/L, 0,25mg/L, 0,30mg/L, 0,35mg/L, 0,40mg/L, 0,45mg/L a 1,00mg/L a byla prokázána na základě korelačního koeficientu R a QC koeficientu a hodnotami RSD ploch. Limit kvantifikace substance Riluzolu byl stanoven na 0,0297mg/l. Riluzol lze tedy bezpečně stanovit v rozsahu 0,03mg/L – 1mg/L.

7. Závěr (Conclusion)

Specifičnost potvrzuje, že hlavní komponenta substance Riluzol je ve zvoleném systému kolona-mobilní fáze dobře separována od mrtvého času kolony. Počet teoretických pater (6832) zajišťuje dobrou účinnost systému. Přesnost metody vyjádřená hodnotami RSD ploch splňuje požadované limity. Ve sledovaném koncentračním rozmezí je zaručena linearita, která byla prokázána na základě hodnot R (0,993) a QC koeficientu (2,68%). Limit kvantifikace (0,0297mg/L) substance Riluzolu je nižší než sledovaná limitní koncentrace 0,3mg/L. Ověření LOQ, vyjádřené RSD ploch (1,506%), potvrzuje přesnost tohoto limitu. V rozsahu 0,03mg/L až 1,00mg/L je zaručena přesnost, správnost a linearita metody. Získaná validační data potvrzují, že HPLC metoda na stanovení obsahu substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle (MeOH) je validní a dostatečně spolehlivá.