

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Disoluční testy suplementu pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu

Bc. Aneta Šnajdrová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Šnajdrová**
Osobní číslo: **C16576**
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**
Název tématu: **Disoluční testy suplementu pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu**
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :


1. Zpracujte literární rešerši týkající se problematiky disoluce pevných lékových forem z hlediska parametrů ovlivňujících rozpustnost aktivních látek.
2. V experimentální části ověřte rozpustnost suplementu ve formě tablety, event. kapsle či granulátu na přístroji Sotax. Pro analýzu aktivní látky vypracujte HPLC metodu a zvalidujte ji.
3. Experimentální data vhodným způsobem zpracujte, proveďte jejich diskusi a popište získané výsledky.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant diplomové práce: **Dr. Ing. Zora Nývltová**
VÚOS
Datum zadání diplomové práce: **6. února 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**


prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 6. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9. 5. 2018

Bc. Aneta Šnajdrová

Zde bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. a Ing. Zoře Nývltové, Dr. za cenné rady, trpělivost a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat jmenovitě Bc. Lucii Bíškové za vedení a pomoc při provádění experimentů, Ing. Lucii Jakubcové za rady a ochotu při sepisování diplomové práce. Celému kolektivu ve výzkumné skupině na pracovišti Analytika VUOS děkuji za korekturu textu a vytvoření příjemného a přátelského prostředí.

Velice děkuji svým rodičům a celé rodině za velikou podporu, péči a trpělivost během mých studií na Univerzitě Pardubice.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá popisem disolučních testů suplementu s obsahem účinné látky L – tryptofan pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu. V teoretické části je popsán disoluční přístroj a metoda, parametry ovlivňující rozpustnost aktivních látek, analytická metoda HPLC a parametry validace. Experimentální část se zabývá validací HPLC metody a zkouškou disoluce tablet s obsahem L – tryptofanu. Kapitola výsledky a diskuze obsahuje vyhodnocená data, popis jednotlivých disolučních zkoušek tablet a jejich porovnání.

KLÍČOVÁ SLOVA

Disoluce, disoluční zkouška, rozpustnost, L – tryptofan, HPLC, validace

TITLE

Dissolution tests of supplements for positive influence of human microbioma

ANNOTATION

The thesis describes dissolution tests of supplement containing an active L – tryptophan ingredient with positive effects on the human microbiome. The theoretical part describes dissolution apparatus and method, the parameters influencing solubility of active substances, the analytical HPLC method and validation parameters. The experimental part deals with the method HPLC validation and dissolution test of tablets with L – tryptophan content. The results and discussion chapter includes evaluated data, description of individual dissolution tests with tablets and their comparison.

KEYWORDS

Dissolution, dissolution test, solubility, L – tryptophan, HPLC, validation

OBSAH

| | |
|--|----|
| ÚVOD..... | 13 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST | 14 |
| 1.1 Disoluce..... | 14 |
| 1.1.1 Disoluční přístroj | 14 |
| 1.2 Disoluční metoda | 21 |
| 1.3 Parametry ovlivňující rozpustnost aktivních látek..... | 21 |
| 1.3.1 Disoluční médium..... | 21 |
| 1.3.2 Odplynění média..... | 22 |
| 1.3.3 Rychlost míchání | 23 |
| 1.3.4 Způsob odběru vzorků | 23 |
| 1.3.5 Filtrace | 24 |
| 1.3.6 Teplota | 24 |
| 1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie..... | 24 |
| 1.5 Validace analytické metody HPLC | 25 |
| 1.5.1 Parametry validace..... | 27 |
| 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 29 |
| 2.1 Validace analytické metody HPLC | 29 |
| 2.1.1 Příprava roztoků..... | 29 |
| 2.1.2 Podmínky chromatografické metody | 30 |
| 2.1.3 Kalibrační roztoky | 31 |
| 2.1.4 Parametry validace..... | 33 |
| 2.2 Zkouška disoluce L - tryptofanu | 35 |
| 2.2.1 Disoluční metoda | 35 |
| 2.3 Přístroje a zařízení..... | 37 |
| 2.4 Chemikálie a standardní látky | 38 |
| 2.5 Vzorky..... | 38 |
| 3. VÝSLEDKY A DISKUZE | 39 |
| 3.1 Vyhodnocení validace analytické metody HPLC | 39 |
| 3.1.1 Linearita | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1.2 | Přesnost | 41 |
| 3.1.3 | Správnost | 42 |
| 3.1.4 | Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) | 43 |
| 3.1.5 | Robustnost | 44 |
| 3.1.6 | Stabilita | 44 |
| 3.1.7 | Použité výpočty..... | 46 |
| 3.2 | Vyhodnocení zkoušky disoluce L - tryptofanu | 47 |
| 3.2.1 | Tablety A | 47 |
| 3.2.2 | Tablety B..... | 51 |
| 3.2.3 | Porovnání tablet A a B..... | 54 |
| 3.2.4 | Použité výpočty..... | 55 |
| | ZÁVĚR | 57 |
| 4. | POUŽITÁ LITERATURA | 59 |
| 5. | PŘÍLOHY | 64 |

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 - <i>Disoluční přístroj [9]</i> | 15 |
| Obrázek 2 - <i>Jednotlivé kroky disoluční zkoušky [11]</i> | 16 |
| Obrázek 3 - <i>Typy disolučních zařízení [8]</i> | 19 |
| Obrázek 4 - <i>Konfigurace disolučních zařízení [11]</i> | 21 |
| Obrázek 5 - <i>Základní schéma LC [32]</i> | 25 |
| Obrázek 6 - <i>Disoluční přístroj SOTAX AT Xtend™ [45]</i> | 37 |
| Obrázek 7 - <i>Kapalinový chromatograf Shimadzu LC 2010C_{HT} [45]</i> | 38 |
| Obrázek 8 - <i>Použité vzorky [45]</i> | 39 |
| | |
| Schéma 1 - <i>Obecné schéma validace analytické metody HPLC [40]</i> | 26 |
| | |
| Graf 1 - <i>Kalibrační křivka vysoké kalibrační řady</i> | 40 |
| Graf 2 - <i>Kalibrační křivka nízké kalibrační řady</i> | 41 |
| Graf 3 - <i>Průměrný disoluční profil tablety A, 50 rpm</i> | 47 |
| Graf 4 - <i>Průměrný disoluční profil tablety A, 75 rpm</i> | 48 |
| Graf 5 - <i>Průměrný disoluční profil tablety A, 100 rpm</i> | 49 |
| Graf 6 - <i>Porovnání disolučních profilů tablet A</i> | 49 |
| Graf 7 - <i>Průměrný disoluční profil tablety A, 100 rpm (koš)</i> | 50 |
| Graf 8 - <i>Disoluční profily tablet A, různé typy míchadel</i> | 51 |
| Graf 9 - <i>Průměrný disoluční profil tablety B, 50 rpm</i> | 52 |
| Graf 10 - <i>Průměrný disoluční profil tablety B, 75 rpm</i> | 53 |
| Graf 11 - <i>Průměrný disoluční profil tablet B, 100 rpm</i> | 54 |
| Graf 12 - <i>Průměrný disoluční profil tablet B</i> | 54 |
| Graf 13 - <i>Porovnání tablet A a B</i> | 55 |
| | |
| Rovnice 1 - <i>Parametr RSD</i> | 46 |
| Rovnice 2 - <i>Výsledné hodnoty průměru</i> | 46 |
| Rovnice 3 - <i>Výpočet odezvového faktoru</i> | 46 |
| Rovnice 4 - <i>Výpočet odchylek pro stanovení stability</i> | 46 |
| Rovnice 5 - <i>Vypočet %</i> | 55 |
| Rovnice 6 - <i>Výpočet % uvolněného L-Trp - korigováno na změnu objemu</i> | 55 |

| | |
|---|----|
| Rovnice 7 - Výpočet X | 56 |
| Rovnice 8 - Zředovací faktor (dilution factor) | 56 |
| Tabulka 1 - Návrh hodnoty pH v trávicím traktu [3] | 22 |
| Tabulka 2 - Přehled kalibračních řad a jejich teoretická koncentrace | 31 |
| Tabulka 3 - Přehled roztoků kalibrační řady I | 32 |
| Tabulka 4 - Přehled roztoků kalibrační řady II | 32 |
| Tabulka 5 - Základní a naředěné roztoky pro stanovení opakovatelnosti metody | 33 |
| Tabulka 6 - Kombinace změn podmínek HPLC | 34 |
| Tabulka 7 - Standardní podmínky metody HPLC | 34 |
| Tabulka 8 - Upravené podmínky metody HPLC | 34 |
| Tabulka 9 - Objem disolučního média v závislosti na čase | 36 |
| Tabulka 10 - Přehled použitých chemikálií | 38 |
| Tabulka 11 - Přehled hodnot kalibrační řady I | 39 |
| Tabulka 12 - Přehled hodnot kalibrační řady II | 40 |
| Tabulka 13 - Vyhodnocení opakovatelnosti nápichu | 41 |
| Tabulka 14 - Vyhodnocení opakovatelnosti metody | 42 |
| Tabulka 15 - Vyhodnocení šumu | 43 |
| Tabulka 16 - Výpočet odezvového faktoru | 43 |
| Tabulka 17 - Výpočet LOD, LOQ | 43 |
| Tabulka 18 - Kombinace parametrů metody HPLC | 44 |
| Tabulka 19 - Dongův algoritmus | 44 |
| Tabulka 20 - Vyhodnocení stability | 44 |
| Tabulka 21 - Shrnutí ověření validace | 45 |

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A – plocha píku (Area)

GIT - gastrointestinální trakt

HCl – kyselina chlorovodíková

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

CH₃COOH – kyselina octová

CH₃OH – methanol

ICH – Mezinárodní konference o harmonizaci (The International Conference on Harmonization)

ISO - Mezinárodní organizace pro normalizaci (The International Organization for Standardization)

L – Trp – L – tryptofan

LC – kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

LOD – mez detekce (limit of detection)

LOQ – mez stanovitelnosti (limit of quantification)

MF – mobilní fáze

Na₃PO₄ · 12 H₂O – dodekahydrát fosforečnan sodný

NaOH – hydroxid sodný

PC – počítač (personal computer)

R – korelační koeficient

R² – koeficient determinace

RF – odezvoový faktor

RSD – relativní směrodatná odchylka

SD – směrodatná odchylka

SF – stacionární fáze

ST – stabilita

Tbl. – tableta

UPW – ultračistá voda

USP – americký lékopis (United States Pharmacopeia)

UV – ultrafialové (ultraviolet)

UV – Vis - Ultrafialovo-viditelná spektroskopie

WHO - Světová zdravotnická organizace (The World Health Organization)

ÚVOD

Testování rozpouštění lékových forem bylo zavedeno v 70. letech 20. století, kdy bylo přijato světovými zdravotními regulačními orgány. Jedná se o *in – vitro* disoluční zkoušky, které poskytují informace o uvolňování léčiva z pevných lékových forem. Disoluce se stala rutinním testem, především perorálních lékových forem, po celém světě a stala se analytickou technikou, kterou využívají mnohé farmaceutické firmy při vývoji léčiv. Testování rozpouštění léčiv pomocí disoluce poskytuje ojedinělé možnosti sledování výrobních parametrů. Mezi hlavní společnosti zabývající se výrobou disolučních přístrojů patří SOTAX a Agilent.

Požadavky na aparaturu, disoluční zkoušku a vyhodnocení výsledků jsou definovány v českém lékopise. Zkouška disoluce probíhá za přesně stanovených podmínek, které ovlivňují rozpustnost aktivních látek v disolučním médiu. Obsah účinné látky je vyhodnocován nejčastěji spektrofotometricky nebo kapalinovou chromatografií.

Cílem diplomové práce bylo provést disoluční test perorálních lékových forem s obsahem účinné látky L – tryptofanu pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu (bakteriálních složek tlustého střeva). Dále popsat parametry ovlivňující rozpustnost aktivních látek, disoluční přístroj, použitou metodu a provést validaci analytické metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Statistickými postupy dále zpracovat naměřená data, provést jejich vyhodnocení a následně prodiskutovat získané disoluční profily jednotlivých typů tablet. Diskuze je prováděna na základě porovnání změn rychlosti otáček, druhu míchacího zařízení a vlivu tloušťky obalu na proces rozpouštění. Předmětem testování jsou tablety, které se vyskytují ve fázi vývoje.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Disoluce

Disoluce, neboli rozpouštění, je analytická technika používaná k určení uvolněného množství účinné látky z farmaceutického produktu. Rozpouštění dávkové formy zahrnuje dva kroky a to tzv. dezintegraci, která popisuje uvolnění léčiva z produktu (nahlíží z pohledu rozpadu matrice) a samotnou disoluci, tedy rozpouštění léčiva v kapalném médiu. Disoluce patří mezi základní metody pro posuzování kvality farmaceutických výrobků a biologické dostupnosti účinné látky *in - vivo* [1] [2].

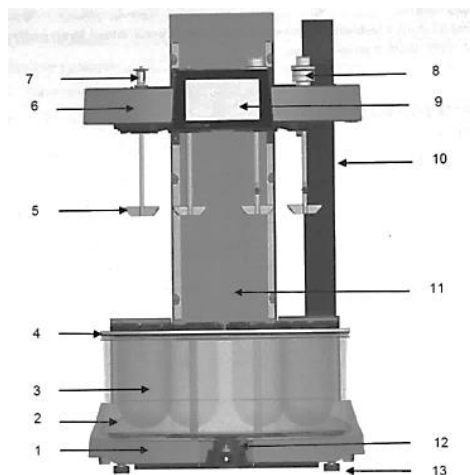
In - vitro disoluční zkoušky poskytují užitečné informace v několika oblastech procesu vývoje léčiv. Disoluce slouží k hodnocení rozpustnosti samotného léčiva, na jehož základě lze zvolit dávkové formy s nejvhodnějším a reprodukovatelným profilem uvolňování. Disoluční profily představují uvolněné množství účinné látky během určeného časového období. Testy rozpouštění je možno využít k určení *in - vivo/in - vitro* korelace mezi uvolněním léku z lékové formy a jeho následné absorpce. Pro kvantitativní stanovení uvolněného množství účinné látky z farmaceutického produktu se využívá chromatografických nebo spektrofotometrických technik. Potřebné nároky na provedení disoluční zkoušky, popis aparatury a následné vyhodnocení je součástí českého, evropského i amerického lékopisu. Disoluční test je jedním z nejhlavnějších charakteristik lékových forem s řízeným uvolňováním léčiva [3] [4] [5] [6] [27] [28].

1.1.1 Disoluční přístroj

Disoluční přístroj je tvořen lázní obsahující nejčastěji 7 disolučních nádob (tzv. žaludků), motorem a hnací hřídelí. Skleněná vodní lázeň je překryta pohyblivým víkem, ve kterém jsou upevněny hřídele pro připojení daných míchadel. Jednotlivé žaludky s obsahem disolučního roztoku jsou téměř celé ponořené ve vodní lázni a celý systém je vyhříván na konstantní teplotu tepelným pláštěm. Na přední straně kovového víka je upevněn dotykový displej pro umožnění nastavení parametrů dané metody. Celé zařízení je upevněno do kovového rámu.

Přístroj pro disoluční test musí být umístěn v prostředí s omezeným znatelným pohybem, třesením

a vibracemi. Tím je udržován stabilní, plynulý chod míchací jednotky a disolučního média [7] [8].



Obrázek 1 - Disoluční přístroj [9]

Obrázek 1 znázorňuje disoluční přístroj (pohled zepředu), který se skládá z následujících částí: rám základny (1), lázeň (2), disoluční nádobka (3), kryt lázně (4), míchadlo (pádelkové) (5), mechanismus míchání (6), připojení hřídele míchadla (7), sací hlavice (8), dotykový displej (9), kanál energie (10), zadní stěna (11), připojení vypouštěcí hadice lázně (12), nastavitelné nožičky (13) [9]

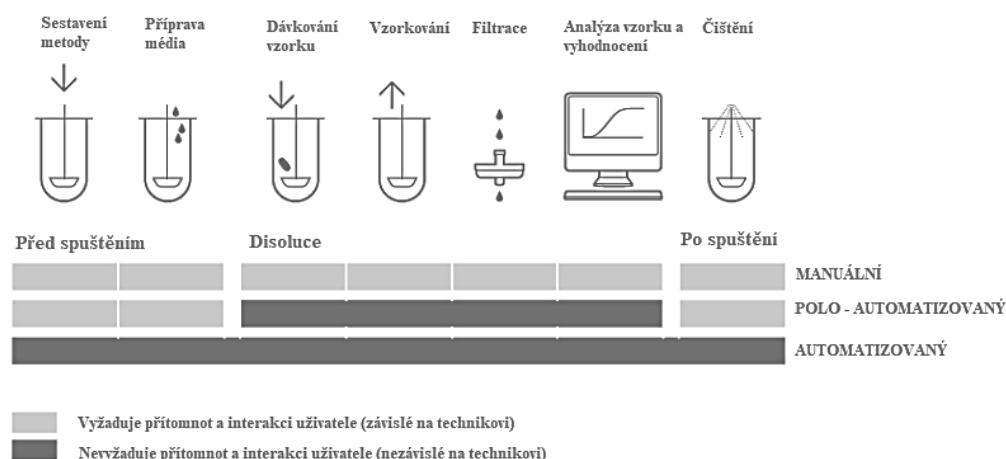
Disoluční žaludky mají tvar válce s půlkulatým dnem s následujícími parametry, které udává lékopis:

- objem: 1 litr
- výška: 160 - 210 mm
- vnitřní průměr: 98 – 106 mm

Hřídel, na kterou se upevňují míchací jednotky, je vyrobena z nerezové oceli. Musí být vycentrována s maximální povolenou odchylkou 2 mm a její rotace musí být plynulá bez znatelného chvění [8].

1.1.1.1 Rozdělení disolučních přístrojů podle stupně automatizace

V současné době se používají přístroje manuální, častěji pak přístroje poloautomatické a plně automatizované [11].



Obrázek 2 - Jednotlivé kroky disoluční zkoušky [11]

Na obrázku 2 jsou uvedeny jednotlivé kroky disoluční zkoušky a přehled automatizovaných/neautomatizovaných kroků pro jednotlivé systémy.

- Manuální přístroj

Při provedení testu disoluce manuálním způsobem je každý procesní krok proveden obsluhou ručně. Je nejvíce závislý na obsluze a způsobu testování [11].

- Polo - automatizovaný přístroj

Polo - automatizované systémy zajišťují všechny sekvenční kroky během disoluční zkoušky samostatně tak, aby byly provedeny reprodukovatelně od činnosti po spuštění do odběru vzorku. Rozeznáváme 2 typy polo - automatizovaných systémů, a to systém s jednou rozpouštěcí lázní, která umožňuje provést 6 zkušebních vzorků nebo systém s dvěma rozpouštěcími lázněmi, které provedou disoluci u 12 zkušebních vzorků [11] [12].

- Automatizovaný přístroj

U plně automatizovaných systémů lze celý pracovní postup naprogramovat - od fáze přípravy (sestavení metody) až po čištění. Může být provedeno několik za sebou jdoucích testů stejných nebo různých vzorků, aniž by byl nutný zásah obsluhy [11].

Plně automatizované přístroje umožňují zvýšení kapacity a přesnosti analýzy. Automatizované přístroje mají mnoho výhod, např.: snadnou kontrolu hardwaru a softwaru, chod systému 24 hodin denně, samostatný odběr vzorků, vysokou přesnost

a reprodukovatelnost, možnosti flexibility a přizpůsobení přístroje dle použité metody. Jejich velkou nevýhodou je však pořizovací cena [7] [13].

1.1.1.2 Rozdělení disolučních přístrojů podle typu použitého zařízení

- Přístroj s použitím košíčků (Přístroj 1)

Zařízení se skládá z válcovitého koše z nerezové oceli nebo může být použit košíček potažený zlatem, do kterého je umístěna dávková jednotka. Spodní část koše je od dna nádoby vzdálena 25 ± 2 mm [8] [14]. Rozměry a další parametry jsou uvedené na obrázku 3A.

- Přístroj s použitím pádel (Přístroj 2)

Jedná se o jednotku tvořenou hřídelí, na jejímž konci je připevněno lopatkové míchadlo tzv. pádlo. Pádlo s hřídelí je vždy pevně spojeno tak, že tvoří jeden celek. Lopatkové míchadlo je nejčastěji vyrobeno z kovu (nerezová ocel) [8] [15]. Nákres pádla je uveden na obrázku 3B.

S použitím tohoto míchacího zařízení lze kombinovat např. stacionární čtyřhranný koš z nerezové drátěné tkaniny, do kterého je umístěna dávková jednotka (tableta, kapsle). Koš je upevněn na ocelové tyči, která je zasunuta přes víko žaludku. Lze také využít tzv. sinkery. Sinkery mají podobu válce, zhotoveného z drátu z nerezové oceli, do kterých se vkládá léková forma. Umožňují klesání kapsle nebo tablety, které běžně na hladině disolučního média plavou [16] [10].

- Přístroj s vratným válcem (Přístroj 3)

Přístroj obsahuje skleněné nádoby tvaru válce s plochým dnem, úchytky z nerezové oceli, sítě z vhodného neabsorbujícího a nereaktivního materiálu, které překrývají horní a spodní část vratných válců, motor a hnací hřídel zajišťující svislý pohyb válců uvnitř nádob. Je zde využito zařízení umožňující nastavení rychlosti a udržení dané míry ponoru v rozmezí $\pm 5\%$. Na horní část vratného válce je upevněno odpařovací víko, které v průběhu zkoušky nepodléhá pohybu [8]. Tento typ míchacího zařízení je uveden na obrázku 3C.

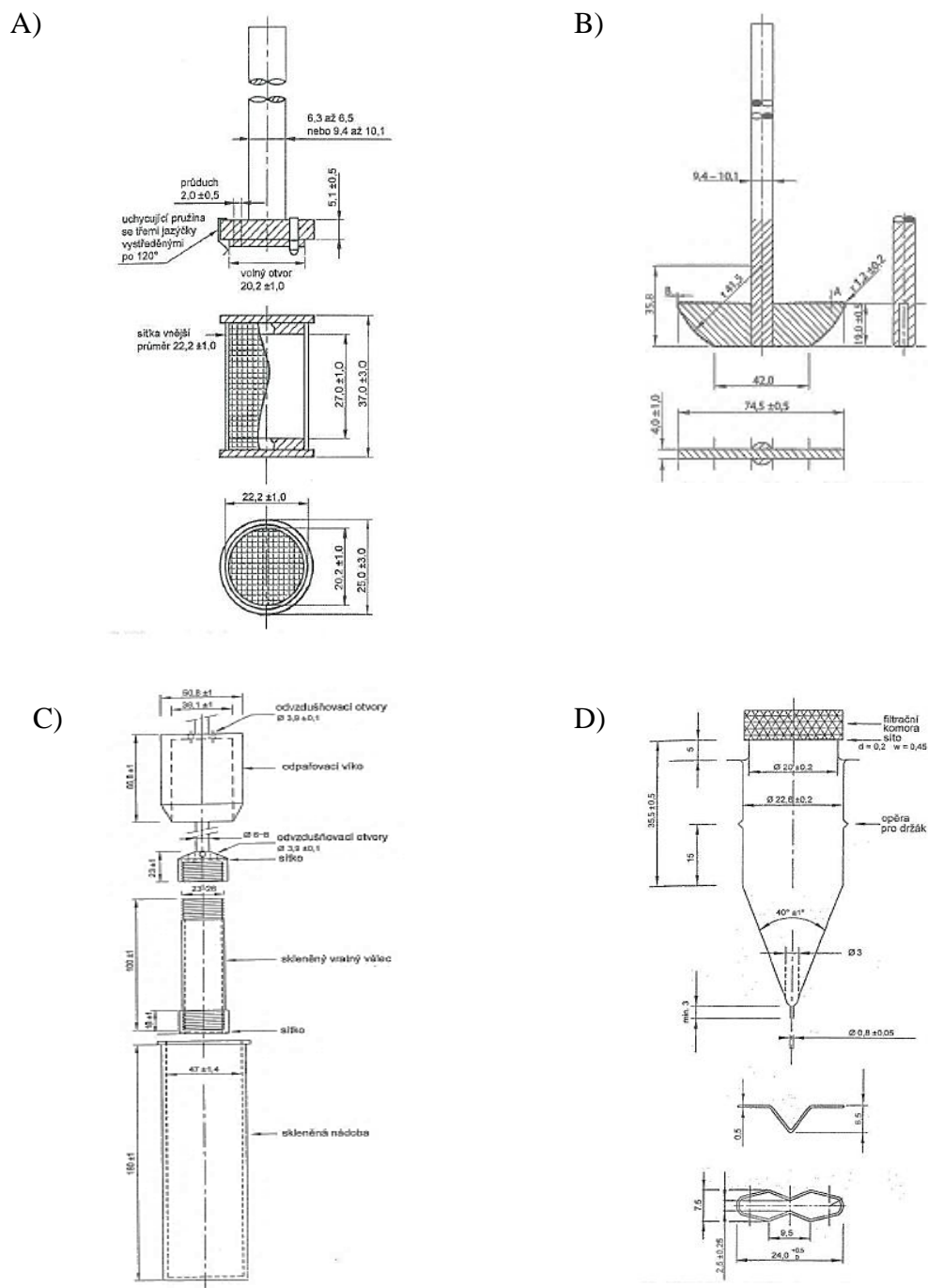
- Přístroj s průtokovou celou (Přístroj 4)

Zařízení se skládá ze zásobní nádoby obsahující disoluční médium, peristaltické nebo pulzní pumpy, průtokové cely a filtračního systému, který odstraňuje nerozpuštěné částice. Pumpa vtlačuje médium nahoru přes vertikálně uloženou průtočnou celu obsahující léčivou formu

za standardních teplotních podmínek, které udržuje na konstantní hodnotě vodní lázeň. Průtokové cely obsahují ve spodní části malé skleněné kuličky (o průměru asi 1 mm) a na vrcholu je umístěna jedna větší kulička (průměr asi 5 mm), která zabraňuje sestoupení lékové formy do vstupní trubky. Množství malých skleněných kuliček je závislé na experimentálním uspořádání. Vzorek lze umístit do držáku, na skleněné lůžko nebo může být vloženo do systému volně. Jako disoluční média mohou být použity běžné pufry nebo biorelevantní média [5] [17] [18]. Technický nákres průtokové cely je uveden na obrázku 3D.

Touto metodou lze testovat např. tablety, prášky, čípky, tvrdé a měkké želatinové kapsle a implantáty. Výhodou tohoto systému je neustále konstantní proudění čistého média s nulovým obsahem účinné látky a možnost výměny disolučního roztoku během jednoho experimentu. Metoda s použitím průtočné cely lépe simuluje podmínky GIT [19] [5].

Všechny uvedené přístroje 1, 2, 3, 4 se využívají pro disoluci pevných lékových forem s běžným uvolňováním, s prodlouženým uvolňováním a se zpožděným uvolňováním [8].



Obrázek 3 - Typy disolučních zařízení [8]

A) košíček; B) pádlo; C) průtoková cela; D) vratný válec

1.1.1.3 Rozdělení disolučních přístrojů podle konfigurace

Disoluční zařízení může pracovat v několika odlišných systémech s různou koncovou metodou analýzy. Disoluční lázeň lze flexibilně kombinovat s dalšími komponenty pro automatický sběr a možnost skladování vzorků. Rozeznáváme systémy off-line, UV - Vis on-line, UV - Vis on/off-line a LC on/off-line [11].

- Off-line systém

Při použití off-line systému (obrázek 4A) dochází ke sběru a skladování vzorku ve standardizovaných zkumavkách nebo vialkách. Vzorky by měly být chráněny před vlivem teploty a před možnou světelnou degradací [11].

- UV - Vis On-line systém

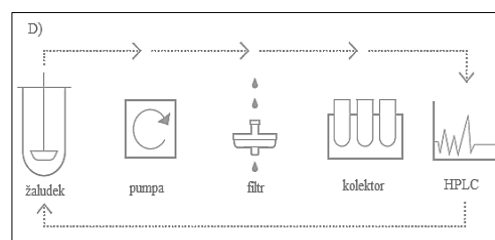
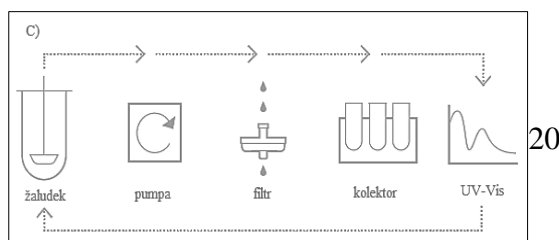
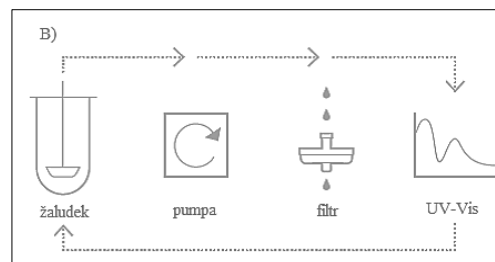
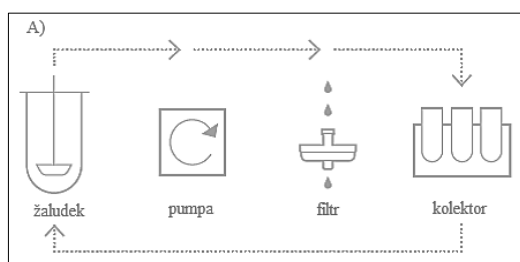
V tomto případě je disoluční lázeň přímo napojená na UV - Vis spektrofotometr (obrázek 4B). Dochází k automatickému odběru a měření vzorků přímo v reálném čase. Díky automatizovanému odběru jsou minimalizovány chyby vznikající při manipulaci se vzorkem. Tento systém umožňuje bezobslužný průběh disoluce a zjištěné výsledky jsou automaticky ukládány [11] [20].

- UV-Vis On/Off-line systém

Tento systém umožňuje kombinaci disoluční lázně s moduly pro automatizovaný sběr a UV – Vis spektrofotometrem (obrázek 4C). Flexibilita poskytuje možnost odběru frakce a měření koncentrace účinné látky spektrofotometrem [11].

- LC On/Off-line systém

Tento typ systému umožňuje automatický odběr, přenos vzorku a následnou injektáž vzorku pro stanovení výsledků metodou kapalinové chromatografie v reálném čase (obrázek 4D). Dochází také k zálohování výsledných dat jednotlivých vzorků [11] [21].



1.2 Disoluční metoda

Při provádění disoluční zkoušky je důležité specifikovat použitý přístroj. Dále pak složení, objem a teplotu disolučního média, rychlost otáčení míchadla, dobu provádění disoluce, objem odebraného roztoku, filtraci a analytickou koncovku. V určených časových bodech se odebírají vzorky uvolněného léčiva. Odebrané množství se buď nahrazuje stejným objemem čerstvého vytemperovaného disolučního média, nebo se médium nedoplňuje a počítá se s jeho úbytkem [3] [10].

1.3 Parametry ovlivňující rozpustnost aktivních látek

Rozpustnost aktivních látek může ovlivnit volba disolučního média, jeho odplynění, rychlost míchadla, způsob odběru vzorku, teplota, ale i např. otřesy. Disoluční testy je tedy nutno realizovat za použití vhodných experimentálních parametrů, které jsou popsány níže [22].

1.3.1 Disoluční médium

Disoluční médium slouží k modelaci *in vivo* rozpouštění léčivé látky. Disoluční médium je voleno na základě znalosti nebo předpokladů fyzikálních a chemických údajů dávkové formy, účinné látky a místa uvolnění v GIT (viz tabulka 1) [22] [10].

Objem média je volen tak, aby byl trojnásobkem objemu potřebného k vytvoření nasyceného roztoku léčivé látky. Pro přístroje 1 a 2 se může objem disolučního média pohybovat v rozmezí 500 – 1000 ml. Nejběžněji využívaným objemem je 900 ml a v některých případech může být zvolen objem 2 - 4 litry. V případě použití přístrojů 3 a 4 se volí nižší objemy disolučního média v intervalu 100 – 200 ml [10].

Nejběžněji využívaná média jsou: zředěná kyselina chlorovodíková, tlumivé roztoky (fosfát/octan) v rozmezí hodnoty pH 1,2 – 7,5. A ev. pro účely výzkumu se používají i roztoky simulující žaludeční nebo střevní tekutinu (např. použití enzymů) [10] [23] [24].

- Přídavek antioxidantu

Při volbě disolučního média je nutno brát ohled na stabilitu vzorku během procesu disoluce. Pro zaručení stability mohou být v některých případech přidány antioxidanty (např. kyselina askorbová), které stabilizují dané léčivo [10].

- Přídavek povrchově aktivních látek

Přídavek povrchově aktivních látek, jako je např. dodecylsulfát sodný, se využívá v disoluční zkoušce špatně rozpustných léčivých forem ve vodných roztocích kyselin nebo pufrů. Účelem povrchově aktivních látek je zvýšení rozpustnosti léčiva [10] [25].

- Přídavek enzymů

Enzymy jsou voleny v disolučním testu pro rozpouštění želatinových kapslí nebo želatinových potahovaných tablet. Nejběžněji používanými enzymy přidávanými do média jsou pepsin (médium o $\text{pH} \leq 4,0$), papain nebo bromelain (médium o $\text{pH} > 4,0$ a $< 6,8$) a pankreatin (médium o $\text{pH} \geq 6,8$). Disolučním médiem jsou definované roztoky např. voda nebo roztoky s hodnotou pH menší/větší než 6,8. V závislosti na pH jsou voleny enzymy, které zvyšují rozpustnost daných kapslí nebo tablet [26].

Tabulka 1 - Návrh hodnoty pH v trávicím traktu [3]

| Část GIT | pH hodnota | Návrh hodnoty pH pro disoluční zkoušku |
|--------------------------------------|-------------------------|--|
| Žaludek | 1,2 – 5 ^a | 1,2 nebo 3,0 ^a |
| <i>doba průchodu</i> | 1 – 5 h | |
| Dvanáctník | 4,5 ^a – 6,5 | 5,5 |
| <i>doba průchodu</i> | 5 – 60 ^a min | |
| Proximální tenké střevo | 6 – 7 | 6,8 |
| Distální tenké střevo | 6,5 – 7,5 | 6,8 a 7,5 |
| <i>doba průchodu v tenkém střevě</i> | 3 – 5 h | |
| Tračník | 5,5 – 8 ^a | 6,8 |
| <i>doba průchodu</i> | 15 – 72 ^a h | |

^a s potravou

1.3.2 Odplynění média

Odvzdušnění média je proces, při kterém dochází k odstranění vzduchových bublin. Bubliny mohou způsobovat přichycení částic na přístroji a stěnách nádoby, mohou zvýšit vztlak, který způsobí rychlejší rozpouštění nebo zmenšit plochu povrchu léčivé formy a tím rychlost rozpouštění snížit. Odplynění média lze například provést inertním plynem (dusík, argon) nebo umístěním do ultrazvuku [10].

Odvzdušňování se běžně neprovádí u roztoků obsahujících povrchově aktivní látky, protože by docházelo k nadměrnému pění a účinek disolučního procesu by byl snížen. Pokud jsou do roztoku povrchově aktivní látky přidávány, doporučuje se provést odvzdušnění před přidáním [10].

1.3.3 Rychlost míchání

Volba rychlosti míchání je závislá na typu vybraného přístroje a na způsobu uvolňování léčivé látky. Rychlost míchání může být nastavena od 25 – 150 rpm (ot./min). Pro přístroj 1, který je vhodný pro kapsle či tablety s okamžitým uvolňováním, se doporučuje rychlost otáček 50 nebo 100 rpm a pro přístroj 2 rychlost otáček 50 a 75 rpm. U produktů s prodlouženým uvolňováním se většinou volí přístroj 2 s rychlostí otáček 100 rpm. Nízké otáčky míchání 25 a 50 rpm jsou vhodné např. pro suspenze. U přístroje 3 je doporučenou rychlostí míchání 5 - 30 ponorů/min a u přístroje 4 je to rychlost průtoku až 50 ml/min s rychlostí průtoku čerpadla až 2 ml/min [10].

1.3.4 Způsob odběru vzorků

Odběry vzorků disolučních roztoků mohou být prováděny dvěma způsoby. A to manuálně nebo automaticky pomocí autosampleru.

- Manuální odběr

Způsob odběru vzorků je ovlivněn rychlostí míchání disolučního roztoku. Při pomalých podmínkách míchání (50 rpm) je důležité provádět odběr vzorku v jednom místě, aby nedocházelo ke změně koncentrace. Také by odběr neměl být proveden blízko hřídele a stěně nádoby. Pro odběr vzorků se používají skleněné a plastové stříkačky nebo např. nerezové kanyly. Tento typ odběru je nejvíce zatížen možností vzniku chyb [10].

- Automatický odběr

Automatický odběr je především volen pro testy vyžadující odběr vzorků v několika časových bodech. Odběr je uskutečňován pomocí trubkových spojů a robotických zařízení, které mohou být polo-automatické nebo plně automatizované [10].

Odběr vzorku z disolučních nádob ve více časových bodech může být uskutečněno třemi způsoby:

- a) definovaný objem vzorku se odebere z rozpouštěcí nádoby a nenahradí se použitým disolučním médiem, což má za následek snížení objemu roztoku,

- b) definovaný objem vzorku se odebere z rozpouštěcí nádoby a nahradí se použitým disolučním médiem, což vede k tomu, že nedochází ke změně objemu roztoku, ale dochází ke snížení koncentrace rozpuštěného léčiva v disolučním médiu,
- c) definovaný objem vzorku se odebere z rozpouštěcí nádoby a po analýze se vrátí zpět do roztoku. Nedochází ke změně objemu roztoku ani nedochází ke změně koncentrace léčiva rozpuštěného v disolučním médiu [4].

1.3.5 Filtrace

Pro získání přesných výsledků testů je důležité odstranění zbytků nerozpuštěného léčiva a pomocných látek. To se provádí pomocí filtrů, přes které protéká disoluční roztok při jeho automatizovaném odběru. Filtrace je často potřebným krokem a měla by být provedena okamžitě po nebo při odběru vzorku. Materiál, ze kterého je filtr zhotoven nesmí obsahovat žádné účinné látky a velikost filtru se volí na základě odebíraného objemu vzorku. Velikost filtračních pórů se pohybuje v rozmezí 0,20 - 70 μm , ale lze dle potřeby využít i rozměry jiné [10].

Filtry mohou být součástí použité metody, jako v případě přístroje 4, kde jsou zařazeny do průtokového procesu, nebo mohou být vkládány manuálně (přístroj 1, 2). Druhy používaných filtrů jsou např. kanylové, filtrové disky nebo frity a filtrační špičky [10].

1.3.6 Teplota

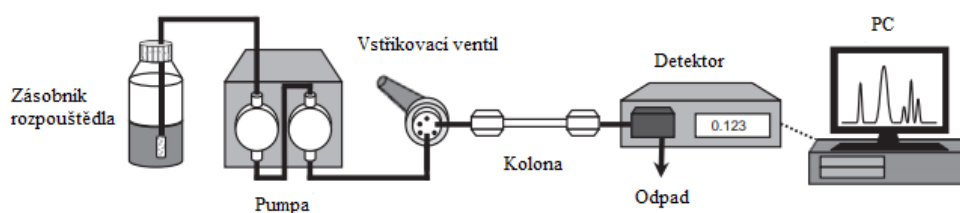
Teplota je důležitým parametrem z hlediska posouzení účinku rozpouštění aktivních látek. Její volba závisí na simulovaném prostředí, kterým je nejčastěji GIT. Tam je teplota volena na $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ [10].

1.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda, která je založená na rozdílech rovnovážných konstant pro složky směsi umístěné v dvoufázové soustavě. Je to systém, ve kterém mobilní fáze prochází přes fázi stacionární [29].

Chromatografické separační metody se vyznačují třemi charakteristickými rysy a to dvěma nemísitelnými fázemi, pohybem fází a distribucí analytů mezi fázemi. Dle principu separace, přístroje a metody rozeznáváme několik základních druhů chromatografických metod: papírová, tenkovrstvá, plynová, kapalinová, vylučovací a superkritická fluidní chromatografie [30].

U kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina, jejíž výběr je závislý na dobré rozpustnosti pro analyzované vzorky a její nízké viskozitě. Stacionární fází je pevná látka nebo kapalina, která je nanesená na nosiči nebo může být využita chemicky modifikovaná pevná látka. Mechanismus kapalinové chromatografie je založený buď na adsorpci, rozdělování, iontové výměně nebo na vylučování. Základní přístroj uvedený na obrázku 5 obvykle obsahuje čerpací systém, dávkovací zařízení, kolonu, detektor a vyhodnocovací zařízení. Množství sledovaných látek eluovaných z kolony umožňuje stanovit použitý detektor [29] [31].



Obrázek 5 - Základní schéma LC [32]

Dnes se v laboratořích běžně využívá vysokotlaká kapalinová chromatografie HPLC (High performance liquid chromatography). Oddělení složek směsi je zde urychleno použitím vyššího tlaku (max. 400 bar), který je zajištěn vysokotlakými čerpadly. Separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie závisí na několika parametrech, jako jsou např. polarita, průtok a pH mobilní fáze, složení a vlastnosti vzorku matrice. Dále také závisí na typu a povaze stacionární fáze. Faktorem ovlivňujícím účinnost separace může být také prostředí, které je charakterizováno parametry jako je teplota, typ detektoru a nastavení parametrů metody [33] [34] [35] [36].

1.5 Validace analytické metody HPLC

Validace (neboli kontrola, ověření) slouží obecně k prověření požadavků a poskytnutí objektivního, vědeckého důkazu splnění těchto požadavků pro specifické zamýšlené použití. Od konce 70. let 20. století po současnost má validace analytické metody celosvětový význam. Je důležitou složkou každé laboratoře zabývající se vývojem a zavedením standardních metod [37] [38] [39].

V současné době existuje několik mezinárodních renomovaných organizací, nabízejících postupy pro validaci metod. Mezi takové organizace patří např.: The International Conference on Harmonization (ICH), The World Health Organization (WHO), The International Organization for Standardization (ISO), The United States Pharmacopeia (USP), a další [38].

Validace analytické metody experimentálně potvrzuje, že je metoda vhodná pro navržené použití. To znamená, že se provádí podrobné šetření s důkazy, že při správné aplikaci analytické metody jsou produkovány výsledky, které jsou vhodné pro daný účel, a potvrzuje účinnost analytické metody s vysokou mírou přesnosti [38] [37].

Toto ověření se musí provádět za přesně definovaných podmínek, které jsou dále dodržované v průběhu celé analytické metody [37].

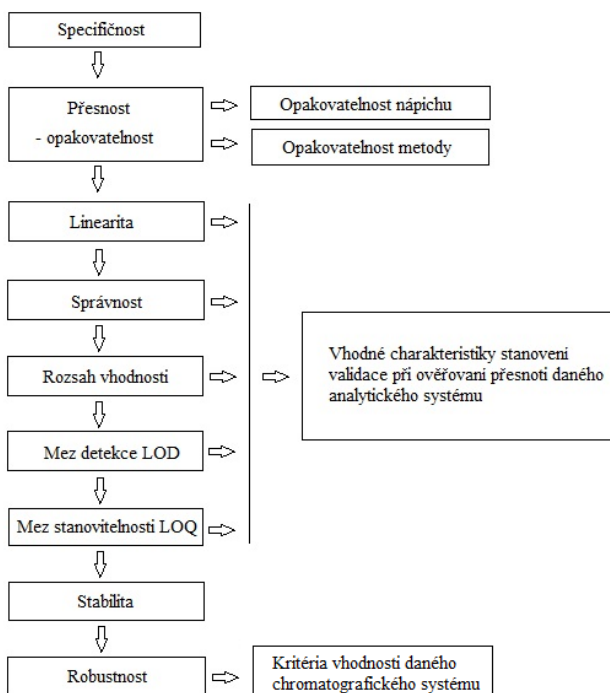


Schéma 1 - Obecné schéma validace analytické metody HPLC [40]

Schéma 1 popisuje obecně všechny parametry, které se v rámci validace metody mohou testovat. Jedná se o charakteristiky: specifičnost, přesnost, linearitu, správnost, rozsah vhodnosti, mez detekce, mez stanovitelnosti, stabilitu roztoků a robustnost. V závislosti na konkrétním typu analytického postupu (např. HPLC) může být podrobena měření pouze část ověřovacích charakteristik [40].

Zkušební postupy pro validaci humánních přípravků slouží k měření přítomnosti analytu v daném vzorku (lékové formě) a představují kvantitativní měření hlavní složky v léčivém přípravku [41].

1.5.1 Parametry validace

1.5.1.1 Specifičnost

V případě validace metody HPLC se jedná o důkaz, že metoda je navržena tak, aby s analytem žádná jiná látka nekolidovala [37].

1.5.1.2 Přesnost

V analytickém postupu přesnost vyjadřuje blízkost shody z vícenásobného odběru stejného homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Může být ovlivněna náhodnými i systematickými chybami, které přesnost umožňuje odhadnout. Tedy do jaké míry systematické chyby ovlivňují určitou metodu. Nejběžněji se přesnost vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka. Je prováděna na homogenních autentických vzorcích [41] [42].

1.5.1.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost je vyjádření přesnosti za stejných definovaných provozních podmínek během krátkého časového intervalu. Opakovatelnost charakterizuje reprodukovatelnost daného analytického postupu pro jeden vzorek analytu. Měření se provádí za stejných podmínek, na stejném přístroji během relativně krátkého časového intervalu. U HPLC metody se provádí opakovatelnost metody a opakovatelnost nápichu [40] [41].

1.5.1.4 Linearita

Linearita je schopnost analytického postupu získat výsledné hodnoty testu, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Je nejběžnějším kalibračním modelem pro znázornění vztahu mezi odezvou analytu (nejčastěji plochou píku) a koncentrací. Stanovuje se nejlépe pro celý validovaný rozsah. Linearita představuje předpoklad existujícího vztahu přímky mezi vstupními (x) a výstupními (y) proměnnými. Jestliže přímka prochází počátkem, můžeme tyto proměnné zapsat matematickým výrazem $y = f(x)$. Platnost tohoto validačního parametru se kontroluje na základě kalibrační křivky a kontrolou korelačního koeficientu R a koeficientu determinace R^2 . Koeficient determinace, který se blíží k jednotce 1, se považuje za dostatečný důkaz dokonalé lineární kalibrace [37] [38] [41].

1.5.1.5 Správnost

Správnost popisuje těsnost shody naměřené hodnoty s přijatou referenční hodnotou. Jedná se o rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou. Provádí se porovnáním se standardem, s ověřenou nebo zavedenou metodou, s referenčním materiálem nebo výsledky z referenční laboratoře [43] [44].

1.5.1.6 Mez detekce (LOD)

Mez detekce představuje nejnižší detekovatelné množství analytu obsaženého ve vzorku, které ale nemusí být exaktně stanovitelné. Hodnota LOD může být závislá na detektorech HPLC a použitých čerpadlech [37] [40]. Vyhodnocuje se na základě poměru signálu k šumu 3:1.

1.5.1.7 Mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez stanovitelnosti neboli kvantitativní limit je nejnižší množství analytu ve vzorku, které lze kvantitativně stanovit s požadovanou hodnotou nejistoty. LOQ se vyhodnocuje na základě poměru signálu k šumu 10:1. Pro hodnocení LOQ u HPLC metody se doporučuje stanovit maximální výchozí šum v blízkosti vrcholu analyzované sloučeniny v intervalu retenčních časů. Využívá se především pro stanovení nečistot nebo degradačních produktů [37] [40] [41].

1.5.1.8 Stabilita

Pro potvrzení stability analytu v roztoku za definovaných podmínek se využívá regresního vztahu pro plochu píku k času. Stabilita určuje, zda je roztok v čase relativně stabilní nebo podléhá jisté přeměně, degradaci, nestabilitě [40].

1.5.1.9 Robustnost

Robustnost představuje neovlivnitelnost analytického postupu při malých záměrných změnách v parametrech měření. Test robustnosti je realizován sérií měření, ve kterých se mění jednotlivé faktory. Některé parametry zůstávají nezměněné (předepsané metodou), u jiných dojde k malé změně. Pokud je metoda alespoň vůči jedné změně nerobustní, musejí být dodrženy přesné základní parametry měření [37] [41].

Důležitými parametry pro vyhodnocení některých základních požadavků validace jsou směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD). Směrodatná odchylka představuje kvadratický průměr odchylek hodnot od jejich aritmetického průměru. Relativní směrodatná odchylka popisuje podíl SD a absolutní hodnoty z hodnoty střední [37].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Validace analytické metody HPLC

Pro provedení validace HPLC metody bylo nutné připravit stejné médium, ve kterém probíhala zkouška disoluce pevných lékových forem se zpožděným uvolňováním. To bylo představováno pufrem složeným z 1500 ml 0,1N kyseliny chlorovodíkové (HCl) a 500 ml 0,2M dodekahydrátu fosforečnanu sodného ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

2.1.1 Příprava roztoků

- **Příprava 0,1N HCl**

Do skleněné odměrné baňky o obsahu 2 L bylo předloženo přibližně 1,5 L ultračisté vody. Bylo odpipetováno 16,7 ml 37% HCl, které bylo přeneseno do obsahu baňky a následně bylo doplněno potřebným množstvím UPW po vyznačenou rysku.

- **Příprava 0,2M Na₃PO₄·12 H₂O**

Dle výpočtu bylo zjištěno potřebné množství (38,012 g) dodekahydrátu fosforečnanu sodného, které bylo odváženo na analytických vahách KERN. Navážená krystalická forma fosforečnanu byla vložena do odměrné baňky o obsahu 500 ml a doplněna těsně po rysku UPW. Pro zajištění dokonalého rozpuštění fosforečnanu, byl roztok vložen přibližně na 10 minut

do ultrazvuku. Po vizuální kontrole rozpustnosti, byla baňka doplněna po rysku potřebným množstvím UPW.

- **Příprava disolučního média**

Pufir byl připraven do odměrné baňky (odpovídající velikosti) z 1500 ml předpřipraveného roztoku 0,1N HCl a 500 ml 0,2M Na₃PO₄·12 H₂O. Vzniklá směs byla následně promíchána skleněnou tyčinkou a bylo nutné provést úpravu pH.

K úpravě pH bylo možno využít 2M HCl nebo 2M NaOH. Pro naše potřeby úpravy pH na požadovanou hodnotu 6,8 ±0,05 byl využit připravený roztok hydroxidu sodného. Úprava pH byla realizována a kontrolována pH metrem. Po dokončení byla baňka překryta ochrannou folií.

- **Příprava mobilní fáze (MF)**

Mobilní fáze je tvořena 20% methanolem (CH₃OH) a kyselinou octovou (CH₃COOH). K výrobě potřebného množství, 1 L MF, bylo smícháno 790 ml UPW, 10 ml kyseliny octové a 200 ml methanolu. Pro dokonalé promíchání a rozpuštění fází byla směs odplyněna na ultrazvuku, následně uzavřena víkem a připravena ke kapalinovému chromatografu.

2.1.2 Podmínky chromatografické metody

- kolona – Poroshell 120 EC-C18; 4.6 x 100 mm, 2.7 μm
- mobilní fáze – 20 % MeOH s 10 mL CH₃COOH / 1 L (izokratická eluce)
- průtok mobilní fáze - 1 mL/min
- teplota kolony 35°C
- tlak na koloně - 23 MPa

- dávkovaný objem - 10 μ L
- UV detekce – 279 nm
- doba analýzy – 5 min
- retenční čas L-Trp – 2,9 min

2.1.3 Kalibrační roztoky

Kalibrační řady byly odvozeny ze znalosti obsahu tryptofanu v jedné účinné dávce. Konečná hodnota L-Trp obsaženého v jedné tabletě je 215 mg a na základě tohoto údaje byly odvozeny teoretické koncentrace tryptofanu v připravených kalibračních řadách, které jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 - Přehled kalibračních řad a jejich teoretická koncentrace

| Kalibrační řada I | | |
|---------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Kalibrační roztoky | Objem [ml/10ml pufu] | Konc. _{teor} [mg/L] |
| CS1 | 0,5 ml CS3 | 0,50 |
| CS2 | 1,0 ml CS3 | 1,00 |
| CS3 | 0,4 ml CS7 | 10,00 |
| CS4 | 3,2 ml CS7 | 80,00 |
| CS5 | 4,0 ml CS7 | 100,00 |
| CS6 | 8,0 ml CS7 | 200,00 |
| CS7 | 12,5 mg/50 ml pufu | 250,00 |
| Kalibrační řada II | | |
| CS1 | 0,5 ml CS3 | 0,05 |
| CS2 | 3,0 ml CS3 | 0,30 |
| CS3 | 0,1 ml SS | 1,00 |
| SS | 10 mg/100 ml pufu | 100,00 |

Kalibrační řada I

Kalibrační řada I se skládá ze sedmi roztoků, které byly připraveny následovně. Prvním krokem bylo navážení čisté účinné látky tryptofanu na analytických vahách. Navážka 12,68 mg byla převedena do 50 ml odměrné baňky, která byla těsně pod rýsku doplněna připraveným pufrům. Pro urychlení rozpustnosti tryptofanu byla takto připravená směs vložena na cca 10 minut do ultrazvuku. Po úplném rozpuštění byla baňka doplněna pufrům po vyznačenou rýsku. Vzniklý čirý roztok byl následně popsán jako SS (=zásobní roztok), který odpovídal kalibračnímu roztoku CS7. Další kalibrační roztoky byly připraveny naředěním tohoto zásobního roztoku nebo naředěním již připraveným roztokem CS7 do 10 ml odměrných baněk. Přehled odpipetovaných objemů a vypočtených teoretických koncentrací je znázorněn v tabulce 3.

Tabulka 3 - Přehled roztoků kalibrační řady I.

| Kalibrační řada I | | |
|--------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Kalibrační roztoky | Objem [ml/10ml pufru] | Konc. _{teor} [mg/L] |
| CS1 | 0,5 ml CS3 | 0,51 |
| CS2 | 1,0 ml CS3 | 1,01 |
| CS3 | 0,4 ml CS7 | 10,14 |
| CS4 | 3,2 ml CS7 | 81,15 |
| CS5 | 4,0 ml CS7 | 101,44 |
| CS6 | 8,0 ml CS7 | 202,88 |
| CS7 | 12,68 mg/50 ml pufru | 253,60 |

Kalibrační řada II

Kalibrační řada II se skládá ze 3 roztoků, které byly připraveny naředěním nově připraveného zásobního roztoku a roztoku CS3 kalibrační řady II. Do 100ml odměrné baňky byla předložena navážka tryptofanu o hmotnosti 10,22 mg. Následoval shodný postup s přípravou kalibrační řady I. Směs tryptofanu a pufru byla pro dokonalé rozpuštění vložena do ultrazvuku a následně byla baňka doplněna disolučním médiem po rýsku. Tabulka 4 obsahuje počet kalibračních roztoků, odpipetovaná množství pro jejich naředění a vypočtené teoretické koncentrace.

Tabulka 4 - Přehled roztoků kalibrační řady II

| Kalibrační řada II | | |
|---------------------------|--|--|
|---------------------------|--|--|

| Kalibrační roztoky | Objem [ml/10ml pufru] | Konc. _{teor} [mg/L] |
|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| CS1 | 0,5 ml CS3 | 0,05 |
| CS2 | 3 ml CS3 | 0,31 |
| CS3 | 0,1 ml SS | 1,02 |
| SS | 10,22 mg/100 ml pufru | 102,20 |

2.1.4 Parametry validace

2.1.4.1 Linearita

Stanovení linearity probíhá na základě vyhodnocení kalibrační křivky ze sady kalibračních roztoků.

2.1.4.2 Opakovatelnost nápichu

Opakovatelnost nápichu byla provedena na roztocích z kalibrační řady I, a to konkrétně CS3 a CS6. Záměrně byly zvoleny roztoky s vysoce rozdílnou hodnotou koncentrace. Experimentálně byla opakovatelnost nápichu realizována 6krát napíchnutím a analyzováním každého roztoku.

2.1.4.3 Přesnost a správnost metody

Na analytických vahách bylo odváženo 6 navážek tryptofanu odpovídající koncentraci 200 mg/L. Hmotnosti přibližující se 10 mg byly převedeny do 50 ml baněk, smíchány s puftrem, ponechány v ultrazvuku do vzniku čirého roztoku a následně doplněny puftrem po rysku. Takto vzniklé základní roztoky byly poté naředěny na odpovídající koncentraci 10 mg/L odpipetováním 2,5 ml/50 ml pufru. Přehled roztoků, navážených hmotností a teoretických koncentrací znázorňuje tabulka 5.

Tabulka 5 - Základní a naředěné roztoky pro stanovení opakovatelnosti metody

| Základní roztoky | Hmotnost [mg] | Konc. _{teor} [mg] |
|-------------------------|---------------|----------------------------|
| 1 | 10,11 | 202,2 |
| 2 | 10,12 | 202,4 |
| 3 | 10,25 | 205,0 |
| 4 | 10,33 | 206,6 |
| 5 | 10,48 | 209,6 |
| 6 | 10,61 | 212,2 |
| Naředěné roztoky | | |
| 1 | - | 10,1 |
| 2 | - | 10,1 |
| 3 | - | 10,3 |
| 4 | - | 10,3 |
| 5 | - | 10,5 |

2.1.4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce byla určena na základě poměru signálu k šumu. Mez stanovitelnosti byla určena na základě šumu, odečteného v úseku retenčních časů, který v našem případě byl 2,4 – 3,4 minuty (skutečný retenční čas L-Trp 2,9 minuty byl stanoven experimentálně).

LOD, LOQ byla provedena 6krát zanalyzováním (napíchnutím) pufru na kapalinovém chromatografu.

2.1.4.5 Robustnost

Ověření robustnosti bylo provedeno na vzorku roztoku z kalibrační řady I CS4. Podstatou zjištění robustnosti byla změna podmínek analýzy HPLC. Tabulky 6, 7, 8 obsahují kombinace změn podmínek metody, data standardních a upravených podmínek. Jak můžeme vidět, nejedná se o radikální změny, ale pouze o malé změny v experimentálních datech metody. Standardní podmínky jsou předem v metodě definované, nebo musejí být zjištěny experimentálně. Upravené podmínky byly zvoleny na základě konzultace a doporučení.

Tabulka 6 - Kombinace změn podmínek HPLC

| Kombinace | | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| a | A | a | A | a | A | a | A |
| b | b | B | B | B | B | b | b |
| C | C | C | c | c | C | c | c |
| D | D | D | D | d | d | d | d |

Tabulka 7 - Standardní podmínky metody HPLC

| Standardní podmínky | |
|---------------------|--------------------------------------|
| A | dávkované množství [μ l] 10 |
| B | průtok [ml/min] 1,0 |
| C | teplota na koloně [$^{\circ}$ C] 35 |
| D | detekce UV [nm] 279 |

Tabulka 8 - Upravené podmínky metody HPLC

| Upravené podmínky | |
|-------------------|-----------------------------------|
| a | dávkované množství [μ l] 9,0 |

| | | |
|---|------------------------|------|
| b | průtok [ml/min] | 0,97 |
| c | teplota na koloně [°C] | 37 |
| d | detekce [nm] | 270 |

2.1.4.6 Stabilita

Stabilita tryptofanu v pufru byla zjištěna na roztocích CS3 a CS6 z kalibrační řady I. Oba roztoky byly skladovány v odměrných baňkách v laboratoři za běžných laboratorních podmínek. Principem provedení byl odběr vzorků roztoků po určitých časových intervalech a jejich následná analýza.

Odběry byly prováděny v časech:

- 0 hod = čerstvě připravený roztok
- 24 hod od přípravy
- 48 hod od přípravy
- 72 hod od přípravy
- 96 hod od přípravy

2.2 Zkouška disoluce L - tryptofanu

Provedení zkoušky disoluce tryptofanu se řídí Českým lékopisem 2009, který obsahuje postup pro pevné lékové formy se zpožděným uvolňováním. Níže uvedená metoda je shodná pro všechny disoluce tryptofanu, které byly prováděny.

2.2.1 Disoluční metoda

Všechny disoluce byly provedeny za použití pádel. Byla provedena i zkouška uvolnění léčivé látky s použitím košíčku. Pro každé jednotlivé měření byly připraveny kalibrační řady dle postupu viz 2.1.3 Kalibrační roztoky, na základě kterých probíhalo vyhodnocení.

2.2.1.1 Disoluční médium

Kyselá fáze

Do jednotlivých žaludků disolučního přístroje bylo převedeno 750 ml 0,1N kyseliny chlorovodíkové (8,335 ml 37% HCl/1 L UPW). Před vložením tablet tryptofanu bylo nutné nádoby zakrýt víkem a médium vytemperovat na požadovaných $37 \pm 0,5$ °C. Také byly nastaveny podmínky metody, tedy rychlost otáček (100, 75, 50 rpm), doba průběhu disoluce (26, 36, 40 hod) a odebírané množství vzorků do vialek (1,5 ml). Po dosažení teploty byly tablety do jednotlivých žaludků vloženy najednou a následovalo okamžité spuštění metody.

Disoluce dávkových forem v kyselém médiu probíhala 2 hod, kdy byl uskutečněn 1. odběr vzorků a pokračovalo se okamžitě fází v tlumivém roztoku.

Fáze v tlumivém roztoku

Fáze v tlumivém roztoku byla realizována přidáním vytemperovaných 250 ml 0,2M dodekahydrátu fosforečnanu sodného ($76 \text{ g Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} / 1 \text{ L UPW}$) k předloženým 750 ml 0,1N HCl. S pomocí 2M NaOH/2M HCl byla v co nejkratším čase upravena hodnota pH na $6,8 \pm 0,05$. Nádoby byly opět přikryty víkem a pokračovalo se v dokončení zkoušky do určené doby.

2.2.1.2 Otáčky

Měření bylo realizováno se změnami v rychlosti otáček a doby provedení disoluce.

Testování probíhalo za následujících otáček:

- 50 rpm
- 75 rpm
- 100 rpm

Zředovací faktor

V disoluční zkoušce nedocházelo k náhradě objemu disolučního média a musela být zahrnuta změna objemu měnící se v čase [4]. V tabulce 9 jsou uvedené hodnoty vypočteného zředovacího faktoru na základě změn objemu disolučního roztoku. Výpočet zředovacího faktoru je uveden v rovnici 5 (viz 3.2.4. Použité výpočty).

Tabulka 9 - Objem disolučního média v závislosti na čase

| Čas odběru vzorku od počátku | Zředovací faktor | V _{média} (mL) | V _{média} (L) |
|------------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| 2 hod * | 1,333 | 750,0 | 0,7500 |
| 2.5 hod | 1,002 | 998,5 | 0,9985 |
| 4 hod | 1,003 | 997,0 | 0,9970 |
| 5 hod | 1,005 | 995,5 | 0,9955 |
| 6 hod | 1,006 | 994,0 | 0,9940 |

| | | | |
|--------|-------|-------|--------|
| 7 hod | 1,008 | 992,5 | 0,9925 |
| 8 hod | 1,009 | 991,0 | 0,9910 |
| 10 hod | 1,011 | 989,5 | 0,9895 |
| 15 hod | 1,012 | 988,0 | 0,9880 |
| 20 hod | 1,014 | 986,5 | 0,9865 |
| 26 hod | 1,015 | 985,0 | 0,9850 |
| 30 hod | 1,017 | 983,5 | 0,9835 |
| 33 hod | 1,018 | 982,0 | 0,9820 |
| 36 hod | 1,020 | 980,5 | 0,9805 |
| 40 hod | 1,021 | 979,0 | 0,9790 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

2.3 Přístroje a zařízení

- Disoluční přístroj SOTAX AT XTend™

Disoluční přístroj SOTAX AT XTend™ zobrazený na obrázku 6 je tvořen základní stanicí se 7 žaludky (6 žaludků - tbl., 7. žaludek - slepý vzorek), víkem a vybranými míchadly (pádla, koše). Přenos vzorků do předpřipravených vialek je umožněn pumpou a plastovými ohebnými hadičkami. Odběr vzorků je prováděn autosamplrem. Jedná se tedy o polo – automatizovaný přístroj s off – line konfigurací zařízení.



Obrázek 6 - Disoluční přístroj SOTAX AT Xtend™ [45]

- Kapalinový chromatograf Shimadzu s UV detekcí

Pro měření vzorků s obsahem účinné látky L-Trp byl využit kapalinový chromatograf Shimadzu LC 2010C_{HT} s UV detekcí (obrázek 7). Byla použita kolona Poroshell 120 EC-C18. Vyhodnocení dat probíhalo v softwaru LCSolution Version 1.22 SP1.



Obrázek 7 - Kapalinový chromatograf Shimadzu LC 2010C_{HT} [45]

- Ultrazvuk Bandelin RK 100 (Německo)
- Analytické váhy Mettler Toledo XS 205DU (USA)
- Předvážky Kern EW 3000 (Německo)
- Přístroj pro přípravu ultračisté vody IWA 20iol, Watek (Česká republika)
- Běžné laboratorní sklo a další nádoby.

2.4 Chemikálie a standardní látky

Tabulka 10 - Přehled použitých chemikálií

| Použité chemikálie | Výrobce | Stát | Čistota |
|--|--------------------|-----------------|---------|
| HCl | Lach – Ner, s.r.o. | Česká republika | 35–38 % |
| Na ₃ PO ₄ ·12 H ₂ O | Sigma - Aldrich | Irsko | ≥98 % |
| CH ₃ OH | Lach – Ner, s.r.o. | Česká republika | ≥99,9 % |
| CH ₃ COOH | Sigma – Aldrich | Irsko | ≥99,8 % |
| UPW | - | - | - |
| Tryptofan | Gonmisol | Španělsko | ≥99,8 % |
| NaOH | Lach – Ner, s.r.o. | Česká republika | ≥98 % |

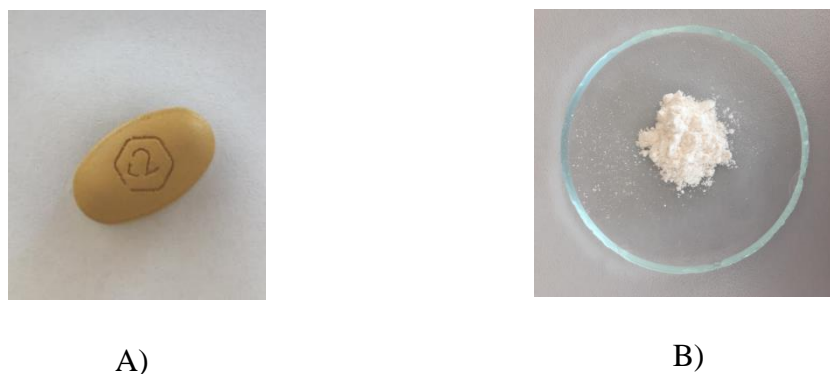
2.5 Vzorčky

Pro testování byly použity tablety **A** a **B** (určené pro výzkumné účely) s vyraženým logem (obrázek 8A). Tablety **A** s 6% (K2Pharm TDS TRP Free sample: L:260417) a **B** s 8% přírůstkem hmotnosti tablety (K2Pharm TDS TRP Free sample: L:280417). Obsah účinné látky L-Trp v tabletách byl 215 mg.

Složení tablet:

- tabletové jádro: modelová látka – L-tryptofan, mikrokrystalická celulóza, maltodextrin, stearan hořečnatý
- obal (potah): neutrální metakrylát – subcoating, hypromellosa, mastek, oxidy železa.

Jako standardní vzorek byl využit dodaný práškový L-Trp zobrazený na obrázku 8B.



Obrázek 8 - Použité vzorky [45]

A) tableta s účinnou látkou L-Trp; B) standardní vzorek L-Trp

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Vyhodnocení validace analytické metody HPLC

3.1.1 Linearita

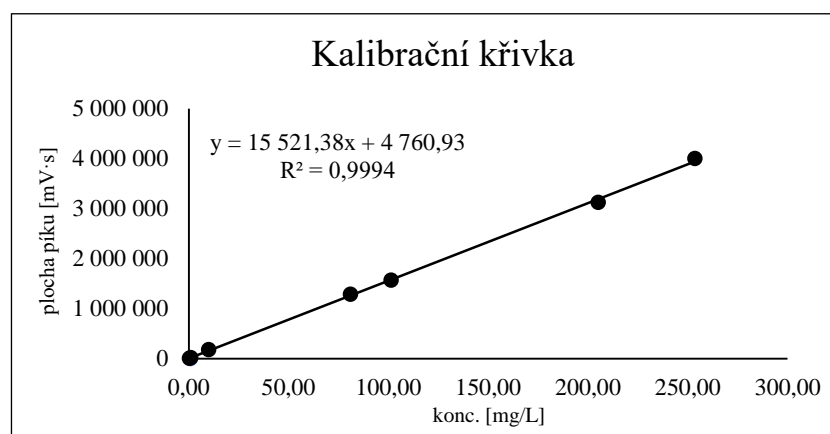
Vyhodnocení linearity bylo provedeno na základě ploch píků v závislosti na teoretické koncentraci. Ze změřených hodnot ploch píků a jejich zprůměrování byla vygenerována rovnice grafu a koeficient determinace R^2 .

Tabulka 11 - Přehled hodnot kalibrační řady I

| Kalibrační řada I | | | |
|--------------------------|------------------------------|-------------------|----------|
| Počet roztoků | Konc. _{teor} [mg/L] | Plocha píku[mV·s] | Průměr Ø |
| CS1 | 0,51 | 8306 | 8331 |
| | | 8356 | |
| CS2 | 1,01 | 17323 | 17359 |
| | | 17394 | |
| CS3 | 10,14 | 175667 | 175739 |
| | | 175811 | |

| | | | |
|-----|--------|---------|---------|
| CS4 | 81,15 | 1286895 | 1286565 |
| | | 1286234 | |
| CS5 | 101,44 | 1566628 | 1566781 |
| | | 1566934 | |
| CS6 | 205,28 | 3121471 | 3121802 |
| | | 3122133 | |
| CS7 | 253,60 | 3994543 | 3994348 |
| | | 3994152 | |

V grafu 1 lze vidět lineární posloupnost kalibračních roztoků. Důkazem linearity je koeficient determinace R^2 0,9994, který se zde velmi blíží hodnotě jedna.

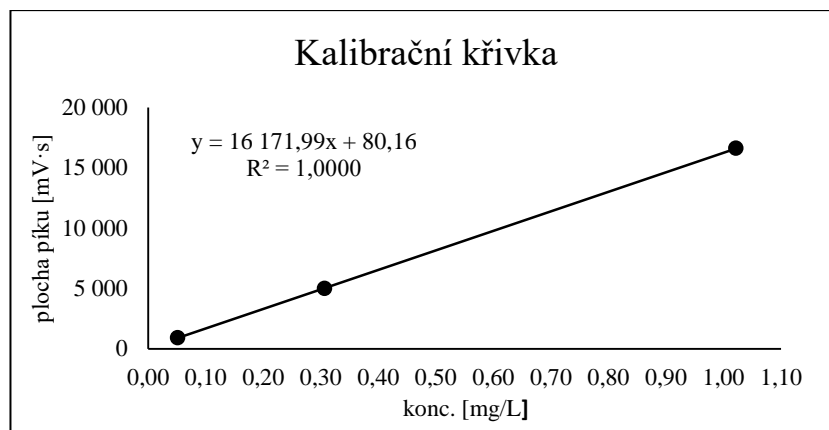


Graf 1 - Kalibrační křivka vysoké kalibrační řady

V tabulce 12 je uveden přehled roztoků kalibrační řady II a v grafu 2 kalibrační křivka.

Tabulka 12 - Přehled hodnot kalibrační řady II

| Kalibrační řada II | | | |
|--------------------|------------------------------|--------------------|---------------------|
| Počet roztoků | Konc. _{teor} [mg/L] | Plocha píku [mV·s] | Průměr $\bar{\phi}$ |
| CS1 | 0,05 | 940 | 931 |
| | | 921 | |
| CS2 | 0,30 | 5034 | 5006 |
| | | 4978 | |
| CS3 | 1,02 | 16682 | 16617 |
| | | 16551 | |



Graf 2 - Kalibrační křivka nízké kalibrační řady

Důkazem linearity je koeficient determinace R^2 , který zde vyšel 1,0000.

Závěr: Obě tyto kalibrační řady vykazují linearitu. Interně byla zvolena minimální hodnota spolehlivosti na 0,99.

3.1.2 Přesnost

- Opakovatelnost nápichu (repeatability of injection)

Vyhodnocení je provedeno na základě ploch píků.

Nejdříve byly naměřené hodnoty ploch píků zprůměrovány, byla vyhodnocena směrodatná odchylka a následně dopočítán parametr RSD (%) dle rovnice 1 (viz 3.1.6. Použité výpočty). Následující tabulka 13 obsahuje výsledné plochy píků a hodnoty pro zisk RSD.

Tabulka 13 - Vyhodnocení opakovatelnosti nápichu

| Opakovatelnost nápichu | | |
|------------------------|----------------------|-------------|
| Počet nápichů | Plocha píku [mV·s] | |
| | CS6 | CS3 |
| 1 | 3121482 | 175987 |
| 2 | 3122460 | 175910 |
| 3 | 3121235 | 176160 |
| 4 | 3122928 | 176128 |
| 5 | 3122150 | 175963 |
| 6 | 3122303 | 175810 |
| Průměr \bar{x} | 3122093 | 175993 |
| SD | 630,67 | 132,23 |
| RSD [%] | 0,02 | 0,08 |

Závěr: Interně byla zvolena maximální hodnota RSD 5%, která nebyla překročena. Pro roztok CS6 je výsledná hodnota 0,02% a pro roztok CS3 0,08%. Opakovatelnost nápichu splňuje stanovený limit 5%.

- Opakovatelnost metody (repeatability of method)

Opakovatelnost metody byla hodnocena na základě hodnot RSD. Po zjištění skutečných koncentrací všech 12 roztoků byl proveden výpočet dle rovnice 1 (viz 3.1.6. Použité výpočty) pro stanovení výsledné hodnoty RSD.

Tabulka 14 - Vyhodnocení opakovatelnosti metody

| Řada 1 | | | | Řada 2 | | |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Počet roztoků | Konc. _{teor} [mg/L] | Konc. _{skut} [mg/L] | Výtěžnost Ø [%] | Konc. _{teor} [mg/L] | Konc. _{skut} [mg/L] | Výtěžnost Ø [%] |
| 1 | 202,20 | 208,07 | 103 | 10,11 | 10,50 | 104 |
| 2 | 202,40 | 211,13 | 104 | 10,12 | 10,28 | 102 |
| 3 | 205,00 | 201,11 | 98 | 10,25 | 9,99 | 97 |
| 4 | 206,60 | 201,96 | 98 | 10,33 | 9,37 | 91 |
| 5 | 209,60 | 205,04 | 98 | 10,48 | 10,15 | 97 |
| 6 | 212,20 | 208,25 | 98 | 10,61 | 9,94 | 94 |
| Průměr ø | | 205,93 | | | 10,04 | |
| SD | | 3,92 | | | 0,39 | |
| Výsledná výtěžnost Ø | | | 100 | | | 97 |
| RSD [%] | | 1,91 | | | 3,85 | |

Závěr: Pro řadu 1 je výslednou hodnotou RSD 1,9 % a pro řadu 2 3,85%. Obě hodnoty splňují navržené RSD max. 10%.

3.1.3 Správnost

Parametr správnosti byl vyhodnocen z výtěžností, jak je uvedeno v tabulce 14. Výsledné hodnoty průměru výtěžnosti byly vypočteny dle rovnice 2 (viz 3.1.6. Použité výpočty).

Závěr: Pro řadu 1 je výsledná hodnota 100%, pro řadu 2 97%. Obě výsledné hodnoty splňují zadanou podmínku 80-120%.

3.1.4 Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez detekce a mez stanovitelnosti se vyhodnocují současně na základě poměru signálu k šumu. Vyhodnocená data jsou uvedena v tabulkách 15, 16, 17. Výpočet odezvového faktoru RF je uveden v rovnici 3 (viz 3.1.6. Použité výpočty).

Tabulka 15 - Vyhodnocení šumu

| Počet nádechů | Šum [mV] |
|----------------------------|---------------|
| 1 | 6,67 |
| 2 | 6,34 |
| 3 | 7,67 |
| 4 | 6,81 |
| 5 | 5,99 |
| 6 | 8,26 |
| Průměr $\bar{\varnothing}$ | 6,96 |
| SD | 0,85 |
| RSD % | 12,14% |

Tabulka 16 - Výpočet odezvového faktoru

| | Konc. _{skut} [mg/L] | Výška píku [mV] | RF [mg/L/mV] |
|----------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| CS1 1 | 0,05 | 166 | 0,000308 |
| CS1 2 | | 165 | 0,00031 |
| Průměr $\bar{\varnothing}$ | | | 0,000309 |

Tabulka 17 - Výpočet LOD,LOQ

| | Vzorec | Výsledek[mg/L] |
|-----|--------------------------|----------------|
| LOD | 3*průměr šumu*průměr RF | 0,01 |
| LOQ | 10*průměr šumu*průměr RF | 0,02 |

Závěr: Šum byl vyhodnocován v intervalu retenčního času 2,4 – 3,4 minuty (pro L-Trp je retenční čas 2,9 min.). Pro splnění parametrů byly stanoveny limitní hodnoty LOD menší než 0,5 mg/L a LOQ menší než 1 mg/L.

Výsledné hodnoty: pro nejmenší detekovatelnou koncentraci (LOD) je výslednou hodnotou 0,01 mg/L a pro nejmenší koncentraci, kterou lze kvantifikovat (LOQ) 0,02 mg/L.

3.1.5 Robustnost

Vyhodnocení robustnosti probíhalo v programu EffiValidation 3.0 Dongovým algoritmem, jehož výsledky jsou v tabulce 19. Vyhodnocení bylo uskutečněno na základě kombinačních změn podmínek metody a změřených ploch píků (A) jak je znázorněno v tabulce 18.

Tabulka 18 - Kombinace parametrů metody HPLC

| | | Kombinace | | | | | | | |
|----------|---|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| | a | A | a | A | a | A | a | A | A |
| | b | b | B | B | B | B | b | b | b |
| | C | C | C | c | c | C | c | c | c |
| | D | D | D | D | d | d | d | d | d |
| St.podm. | A | 1286565 | 1286565 | 1286565 | 1286565 | 1286565 | 1286565 | 1286565 | 1286565 |
| Up.podm | A | 1201361 | 1332166 | 1162544 | 1290244 | 1100474 | 1220084 | 1135280 | 1260439 |

Tabulka 19 - Dongův algoritmus

| Faktor | Efekt faktoru | Kritický efekt | Hypotéza |
|--------|---------------|------------------|----------|
| 1 | -2163.5 | 132360.547150787 | True |
| 2 | -41007.5 | 132360.547150787 | True |
| 3 | 32429.5 | 132360.547150787 | True |
| 4 | 34469 | 132360.547150787 | True |

Závěr: Výsledkem je zjištění, že daná analytická metoda je robustní, což znamená, že malá změna experimentálních podmínek nemá vliv na výsledná data = metoda je nezávislá na malé změně podmínek.

3.1.6 Stabilita

Potvrzení stability tryptofanu v daném disolučním médiu lze odvodit na základě malých odchylek zjištěných z průměrů ploch píků, jak je znázorněno v následující tabulce 20.

Tabulka 20 - Vyhodnocení stability

| Stanovení | Plocha píku [mV·s] | Odchylky ST [%] | Plocha píku[mV·s] | Odchylky ST [%] |
|-----------|-----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | CS3 | | CS6 | |
| 0 hod | 175859 | | 3122309 | |
| | 176081 | | 3122881 | |

| | | | | |
|----------|------------------|--------------|--------------------|-------------|
| Průměr Ø | 175970 | | 3122595 | |
| 24 hod | 175548 175722 | | 3175209 3176129 | |
| Průměr Ø | 175635 | -0,19 | 3175669 | 1,70 |
| 48 hod | 175583 175635 | | 3179931 3180197 | |
| Průměr Ø | 175609 | -0,21 | 3180064 | 1,84 |
| 72 hod | 175933 175560 | | 3187946 3186041 | |
| Průměr Ø | 175746,5 | -0,13 | 3186994 | 2,06 |
| 96 hod | 177188 177127 | | 3192369 3189985 | |
| Průměr Ø | 177157,5 | 0,68 | 3191177 | 2,20 |

Odchytky ST byly vypočítány dle rovnice 4 (viz 3.1.6. Použité výpočty).

Závěr: Jelikož jsou odchytky nízké, můžeme tvrdit, že roztoky L-Trp s koncentracemi 10 mg/L a 200 mg/L jsou stabilní po dobu 96 hodin.

Všechny parametry validace potvrdily vhodnost analytické metody HPLC. Přehled parametrů, referenčních a naměřených hodnot je uveden v tabulce 21.

Tabulka 21 – Shrnutí ověření validace

| Parametr | Referenční hodnota | Naměřená hodnota | Potvrzení |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|
| Linearita | ≤ 0,99 | 0,9994; 1,0000 | ANO |
| Opakovatelnost nápichu | ≤ 5% | 0,02%; 0,08% | ANO |
| Opakovatelnost metody | ≤ 10% | 1,9%; 3,85% | ANO |
| Správnost | 80 – 120% | 97%; 100% | ANO |
| LOD | ≤ 0,5 mg/L | 0,01 mg/L | ANO |

| | | | |
|------------------|----------|-----------|-----|
| LOQ | ≤ 1 mg/L | 0,02 mg/L | ANO |
| Robustnost | - | - | ANO |
| Stabilita | - | - | ANO |

3.1.7 Použité výpočty

Rovnice 1 - Parametr RSD

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{\phi}} \cdot 100$$

RSD.....relativní směrodatná odchylka [%]

SD.....směrodatná odchylka

$\bar{\phi}$průměr

Rovnice 2 - Výsledné hodnoty průměru

$$\bar{\phi} = \frac{C_{skut}}{C_{teor}}$$

C_{skut}koncentrace skutečná [mg/L]

C_{teor}koncentrace teoretická [mg/L]

Rovnice 3 Výpočet odezvového faktoru

$$RF = \frac{C_{skut.}}{Výška píku}$$

Rovnice 4 - Výpočet odchylek pro stanovení stability

$$ST (\%) = \frac{\bar{\phi}_{ti} - \bar{\phi}_{t0}}{\bar{\phi}_{t0}}$$

$\bar{\phi}_{ti}$ průměry i roztoků v čase t

$\bar{\phi}_{t0}$průměr roztoků v čase $t 0$ hod

3.2 Vyhodnocení zkoušky disoluce L - tryptofanu

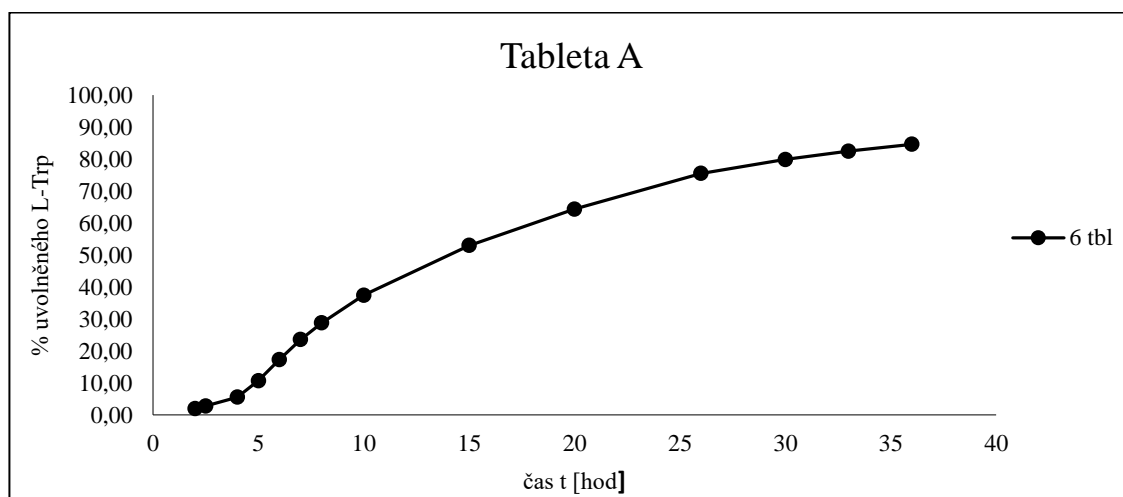
3.2.1 Tablety A

Disoluční zkouška 6% tablet probíhala 36 hod se změnami rychlosti otáček 50, 75, 100 rpm.

Disoluční zkouška s rychlostí otáček 50 rpm

Data a grafy disolučních profilů šesti zkoumaných tablet jsou uvedena v Příloze A.

Během průběhu disoluce nebylo pozorováno žádné vychýlené chování tablet. Všechny vzorky v disolučním médiu podléhaly stejným tvarovým a barevným změnám. Obal tablet byl prasklý jen z části, tvořil se puchýř v místě loga tablety. Kvůli nízké rychlosti otáček a skoro nulovému pohybu tablet se předpokládala nízká koncentrace účinné látky po uplynutí předepsaného času.



Graf 3 - Průměrný disoluční profil tablety A, 50 rpm

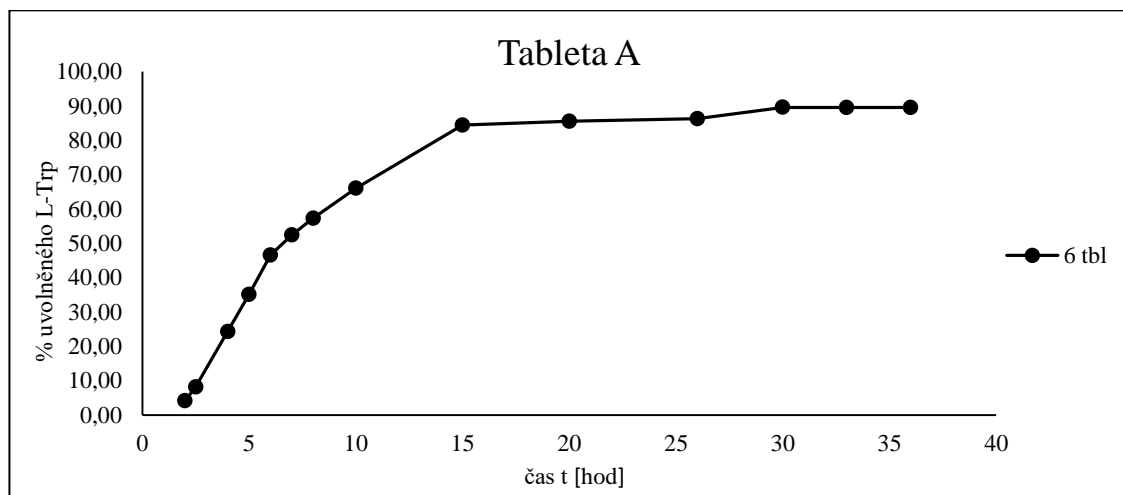
Disoluční profil znázorněný v grafu 3 je průměrem disolučních profilů šesti testovaných tablet při rychlosti otáček 50 rpm. Ke zlomu navýšení koncentrace došlo v čase 5 hod

Disoluční zkouška s rychlostí otáček 75 rpm

Data a grafy disolučních profilů šesti zkoumaných tablet jsou uvedena v Příloze B.

Během zkoušky disoluce byly vizuálně zaznamenány určité změny chování tablet. Tablety 2, 3, 4, 6 vykazovaly téměř shodné chování v disolučním médiu. V čase mezi 10 – 15 hod u nich

došlo k prasknutí obalu a tím uvolnění stejného množství účinné látky. Tablety 1 a 5 se během pokusu svými změnami odchylovaly. U tablety 1 nebyl pozorován vznik „nafouklého“ puchýře ze strany tablety s logem. Tím lze zdůvodnit odchýlení disolučního profilu od ostatních tablet, dokud nedošlo k tvorbě a prasknutí puchýře a uvolnění shodného množství L-Trp jako v tabletách 2, 3, 4, 6. U tablety 5 došlo ke vzniku puchýře přibližně v 7. hodině, proto se vychyluje od průběhu ostatních. Všechny disoluční profily se prakticky překrývají v bodě 25 hodin a od 15 hod. (krom tablety 5) mají rovnoměrný průběh.



Graf 4 - Průměrný disoluční profil tablety A, 75 rpm

Graf 4 znázorňuje křivku průměrů disolučních profilů šesti vzorků tablet. Křivka je strmě rostoucí od 2 do 15 hodiny, kdy se L-Trp v čase uvolňuje lineárně.

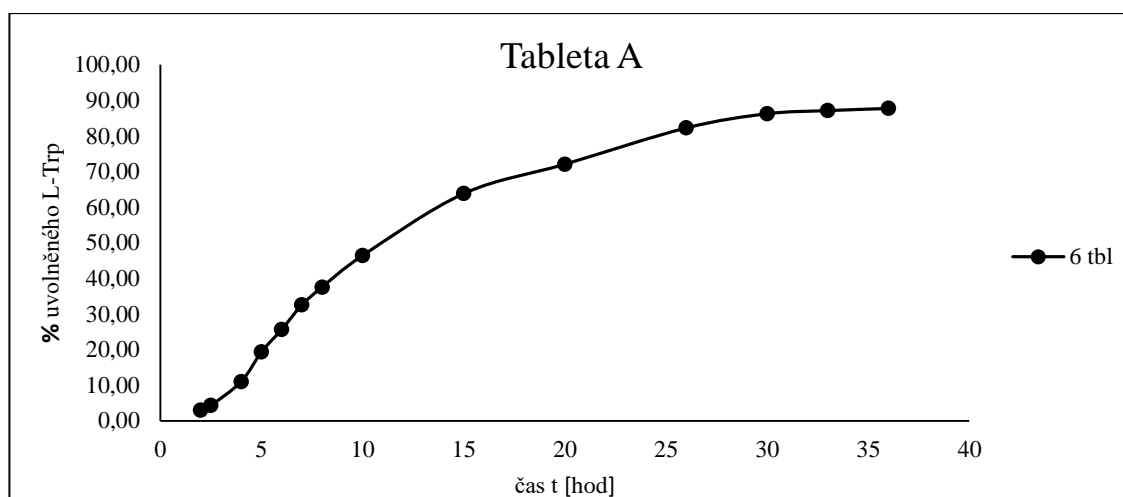
Disoluční zkouška s rychlostí otáček 100 rpm

Data a grafy disolučních profilů šesti zkoumaných tablet jsou uvedena v Příloze C.

Výjimkou zde bylo, že došlo k nastavení různých časových dob a experimenty byly provedeny dva. Nejdříve pro 26 hodin a následně se změnou časového úseku na 36 hodin. Kvůli nedostatku počtu tablet byl pokus pro 36 hodin uskutečněn pouze pro 3 tablety. Vyhodnocení tedy probíhalo na dvě kalibrační křivky, které jsou uvedeny v příloze C.

V grafu Disoluční profily (příloha C) jsou zobrazeny disoluční profily všech šesti tablet. Všechny měřené vzorky mají prakticky shodný průběh křivek až na křivku tablety 2 z 36 hodinového měření. U té byl v bodě 15 hodin zaznamenán velký puchýř, který byl pozorován ještě při 24 hodinách. To je nejspíše důvod vychýlení disolučního profilu. U tablety 3, ze stejného měření, lze pozorovat propad koncentrace mezi 15 a 25 hodinou.

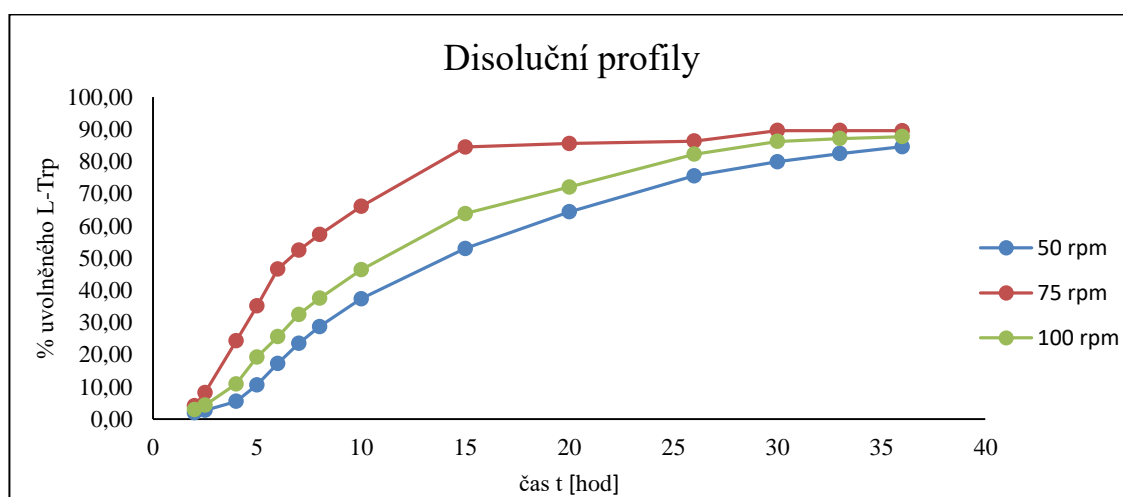
Při vizuální kontrole byl zjištěn roztrhnutý obal nad tabletou a v pozdějších hodinách došlo k oddělení kusu tabletoviny, který se volně pohyboval v médiu. V časové době 26 hodin se tablety nacházely ve stejné podobě a uvolněná tabletovina z tablety 3 byla rozpuštěna v disolučním médiu. V čase 36 hodin se tablety 1, 2, 3 (z 36 hodinového měření) setkávají ve stejné koncentraci, u tablet 1, 2, 3 (z 26 hodinového měření) by se dal takový výsledek předpokládat.



Graf 5 - Průměrný disoluční profil tablety A, 100 rpm

Graf 5 znázorňuje souhrnný disoluční profil pro tablety A s rychlostí otáček 100 rpm. Je vidět v celku pravidelné rostoucí množství uvolněného L – Trp v disolučním médiu.

Závěr: Porovnání disolučních profilů tablet A při různých rychlostech míchání.



Graf 6 - Porovnání disolučních profilů tablet A

Při porovnání průměrných disolučních profilů pro rychlost otáčení 50, 75 a 100 rpm, které jsou znázorněné v grafu 6 lze vidět jisté rozdíly. Disoluční profily při rychlosti otáčení 50 a 100 rpm mají stejný tvar křivek. Dalo by se tedy říct, že průběh disoluční zkoušky je při těchto otáčkách shodný.

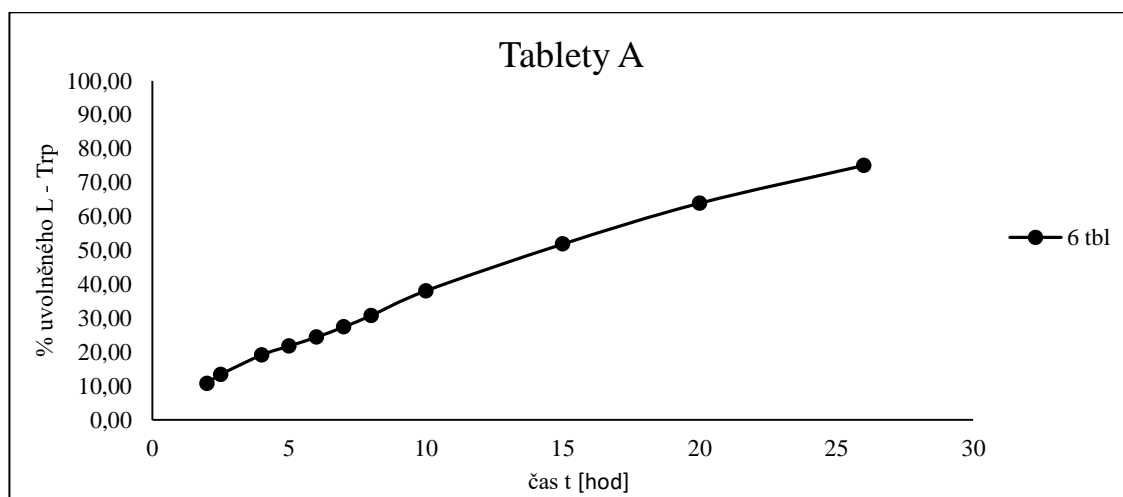
Disoluční profil tablet při rychlosti otáčení 75 rpm je zcela odlišný. V časových intervalech od 2 do 15 hodin je strmě rostoucí a poté rovnoměrný.

Disoluční zkouška s rychlostí otáček 100 rpm s použitím košíčků

Data a grafy disolučních profilů šesti zkoumaných tablet jsou uvedena v Příloze G.

Zkouška disoluce proběhla pro 6 tablet s rychlostí otáček míchání 100 rpm, 26 hodin. Místo pádel zde byly použity kovové košíčky, do kterých byla vložena tableta.

Z grafu Disolučních profilů v příloze G lze vidět prakticky lineární průběh všech křivek pro jednotlivé tablety. Při průběhu testu disoluce bylo viditelné mechanické poškození tablet, které se otíraly o stěny kovového košíčku. Z důvodu použití prakticky neprůhledných košíčků nebylo možné další pozorování, takže nebyly zaznamenány tvarové změny tablet, jako vznik puchýřků, praskání obalu atd.

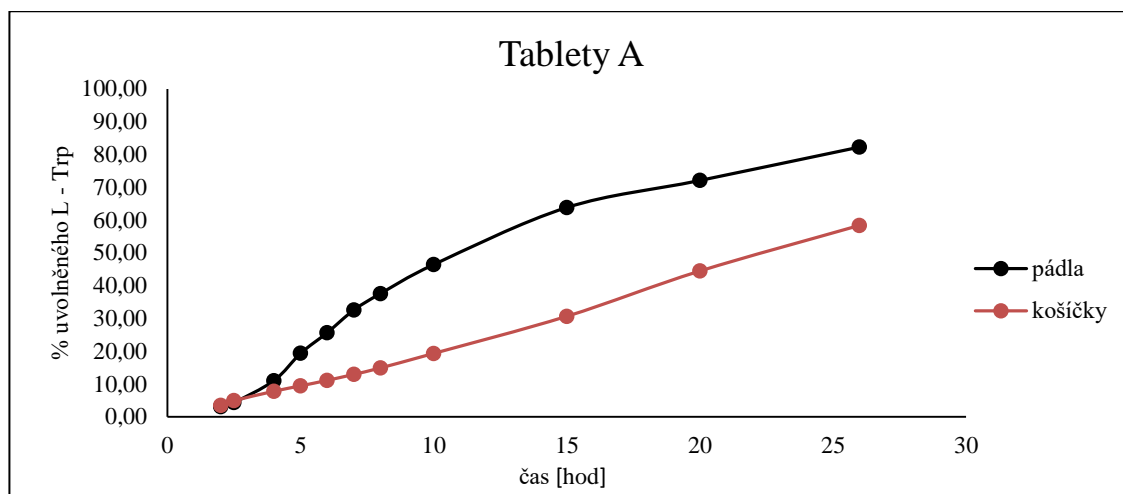


Graf 7 - Průměrný disoluční profil tablety A, 100 rpm (koš)

Disoluční profil (graf 7) 6 tablet má tvar téměř lineární křivky, takže docházelo k rovnoměrnému nárůstu koncentrace L-Trp v disolučním médiu.

Tento typ míchání byl vyhodnocen za nevhodný, kvůli mechanickému poškození tablet a neumožnění vizuálního pozorování.

V grafu 8 je uvedeno srovnání disolučních profilů tablet A při rychlosti otáčení 100 rpm pro pádla a košíčky.



Graf 8 - Disoluční profily tablet A, různé typy míchadel

Disoluční profily jasně dokazují rozdílnost v použití různých typů míchacích jednotek. Při použití pádel docházelo ke strmějšímu nárůstu koncentrace L – Trp v čase, kdežto křivka disolučního profilu košíčků má téměř lineární průběh, docházelo tedy k postupnému rovnoměrnému uvolnění L – Trp.

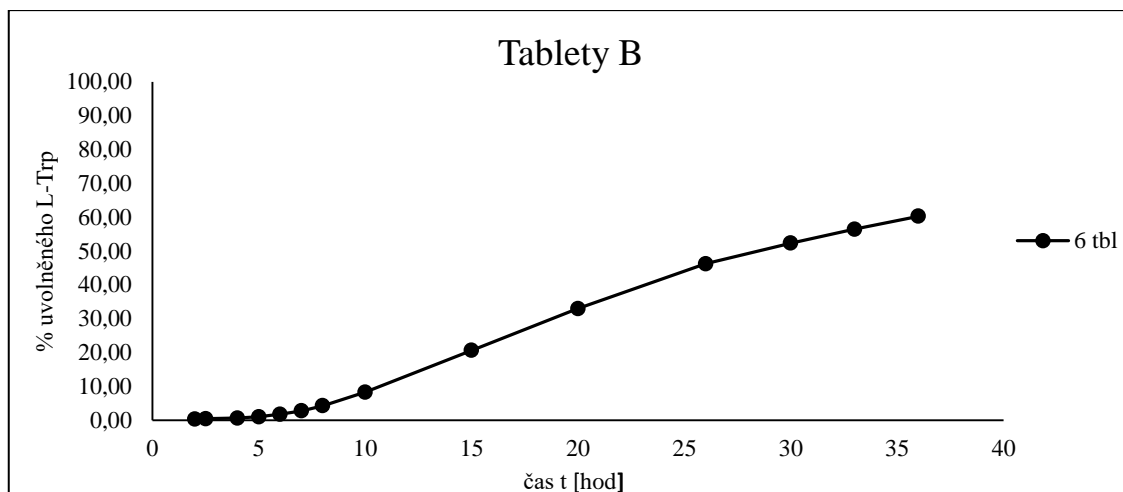
3.2.2 Tablety B

Disoluční zkouška 8% tablet probíhala 36 hod se změnami rychlosti otáček 50, 75, 100 rpm.

Disoluční zkouška s rychlostí otáček 50 rpm

Data a grafy disolučních profilů šesti zkoumaných tablet jsou uvedena v Příloze D.

Disoluční profil tablety 6 je odlišný. U této tablety došlo po 4 hodinách disoluce k vytvoření malé boule na jejím obalu, která přetrvala do časového bodu 20 hod. Nedošlo u ní k nafouknutí obalu jako u ostatních tablet, kde se tvořily během průběhu experimentu puchýře okolo celé tablety. U tablet nedošlo dále k výrazným proporčním změnám. Po ukončení disoluce bylo zjištěno vysoké množství tabletoviny uvnitř tablety, nedošlo k jejímu výraznému uvolnění, a tudíž byla předpokládána nižší uvolněná koncentrace L-Trp v disolučním médiu.



Graf 9 - Průměrný disoluční profil tablety B, 50 rpm

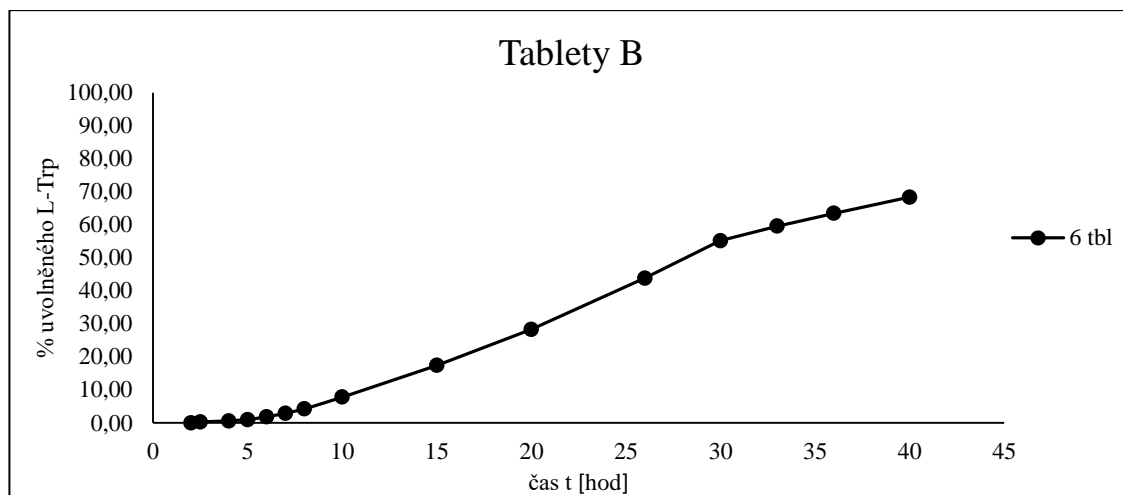
Graf 9 znázorňuje průměrný disoluční profil tablet **B** při rychlosti otáček 50 rpm. Lze vidět téměř lineární průběh s nízkými hodnotami na počátku křivky, což je žádoucí.

Disoluční zkouška s rychlostí otáček 75 rpm

Data a grafy disolučních profilů šesti zkoumaných tablet jsou uvedena v Příloze E.

Disoluční profily jednotlivých tablet uvedené v grafu přílohy E jsou rozmístěné v širokém pásmu. Velice se liší jejich průběh. Nejvíce od přibližných křivek tablet 2, 3, 5, 6 odbíhají křivky tablet 1 a 4. Tableta 1 disponuje největší uvolněnou koncentrací L-Trp, což bylo dáno jejím chováním v disolučním médiu. V bodě 22 hodin vznikl z obalu této tablety veliký puchýř a došlo k uvolnění velkého kusu tabletoviny, který se následně rozpustil. Na konci disoluce byl pozorován pouze nafouklý prázdný obal bez náplně tablety. U tablety 4 lze pozorovat výrazně nižší koncentraci než u ostatních tablet, které se sbíhají na konci disoluce téměř v jednom bodě. Zřejmě je to způsobeno vznikem malého puchýřku a nedostatečným uvolněním tabletoviny skrz obal. U ostatních obalů tablet docházelo během procesu k tvorbě bublinek a puchýřků.

Tato disoluce byla provedena do 40 hodin.



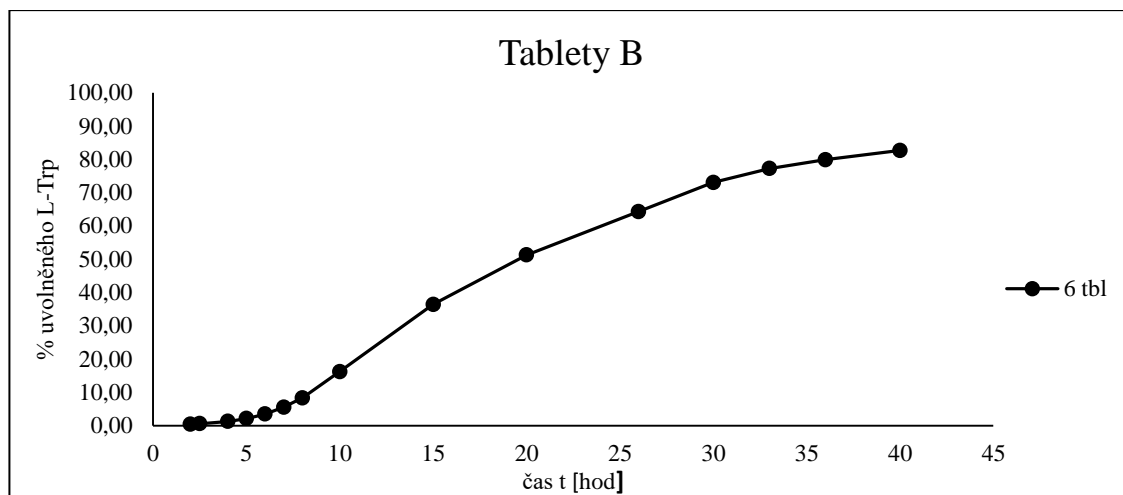
Graf 10 - Průměrný disoluční profil tablety B, 75 rpm

Souhrnný disoluční profil uvedený v grafu 10 vykazuje téměř lineární křivku s vychýlením v bodě 30 hodin. Na počátku disoluce (v kyselé fázi a prvních hodinách v tlumivém roztoku) jsou koncentrace opět blízké nule.

Disoluční zkouška s rychlostí otáček 100 rpm

Data a grafy disolučních profilů šesti zkoumaných tablet jsou uvedena v Příloze F.

Tablety se ihned po vhození do kyselé fáze přichytily na stěnu žaludku a docházelo k okamžitému rozpouštění vrchní barevné vrstvy tablety. Po chvíli došlo k odbarvení tablet z barvy oranžovo – hnědé na bílo – žlutou. Křivky disolučních profilů v grafu příloha F mají podobný průběh. Největší odchylkou je vzorek 2 a 1, ve kterých došlo ke strmému nárůstu koncentrace. Všechny tablety po 2 hodinách v kyselé fázi a 2 hodinách v tlumivém roztoku začaly lehce bobtnat. V bodě 20 hodin od spuštění disoluce došlo u obou vychýlených vzorků ke vzniku velkého nafouklého puchýře a u tablety 2 se obal začínal trhat. Na rozdíl od téměř nezměněných ostatních tablet byl obal v 28 hodinách tablety 2 roztržen a u tablety 1 došlo ke zvětšení puchýře. Ve 30 hodinách došlo u ostatních tablet k úbytku tabletoviny. Na konci disoluce byla tabletovina tablety 2 zcela rozpadlá na prach, který byl usazen na dně žaludku a obal se pohyboval volně v disolučním médiu. U ostatních tablet zůstal puchýř kolem tabletoviny.

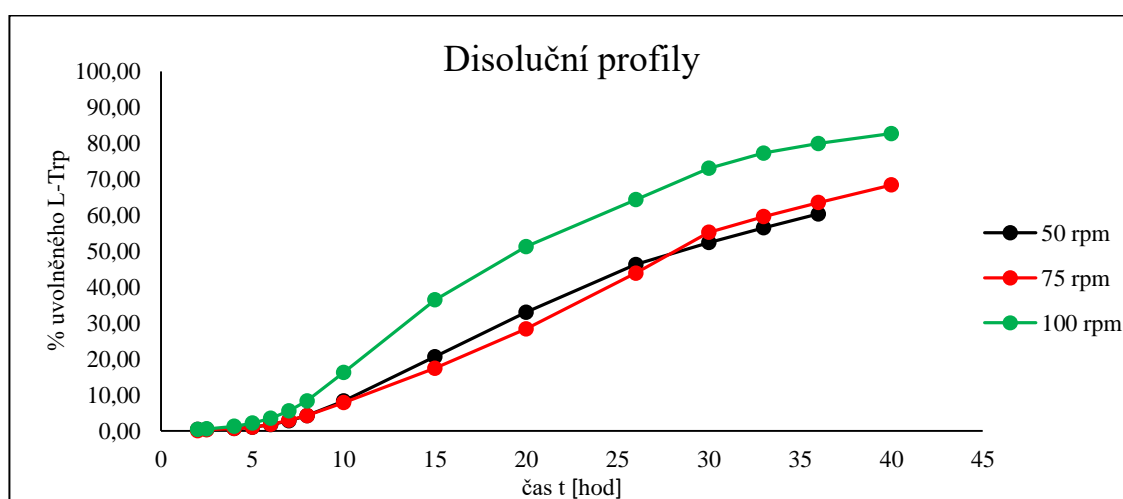


Graf 11 - Průměrný disoluční profil tablet B, 100 rpm

Graf 11 znázorňuje disoluční profil všech 6 tablet a vypovídá o narůstající koncentraci uvolněného L-Trp.

Na základě požadavku zákazníka byla disoluce provedená do 40 hodin.

Závěr: Porovnání disolučních profilů tablet **B** při různých rychlostech míchání.

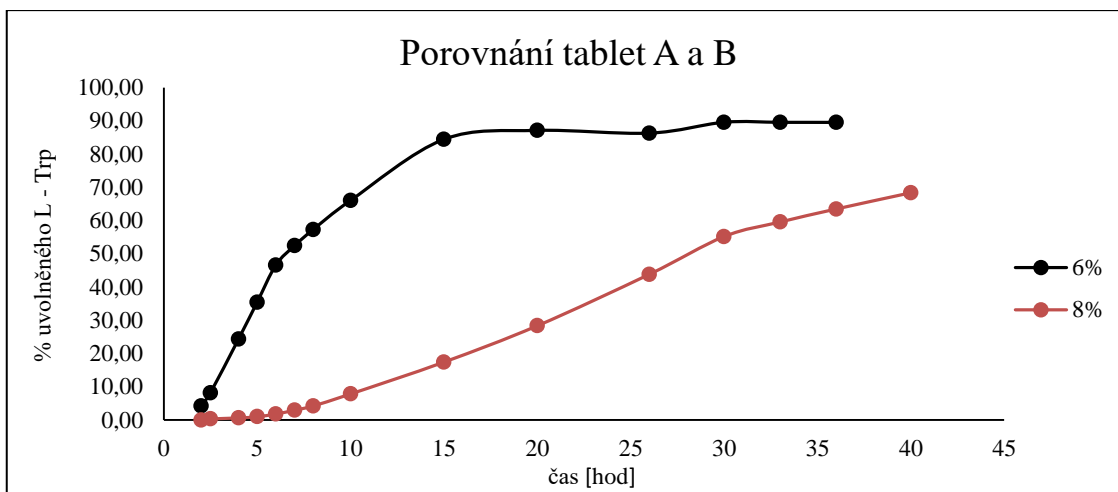


Graf 12 - Průměrný disoluční profil tablet B

Z porovnání disolučních profilů v grafu 12 lze určit podobnost lineárního průběhu experimentu pro rychlost otáček 50 a 75 rpm. Při rychlosti otáček 100 rpm dochází viditelně k uvolnění většího množství L-Trp z tablety.

3.2.3 Porovnání tablet A a B

Porovnání tablet **A** a **B** bylo provedeno pro rychlost otáček 75 rpm.



Graf 13 - Porovnání tablet A a B

Z porovnání disolučních profilů lze zhodnotit uvolňování L-trp v závislosti na tloušťce obalu tablety. Zesílením obalu u tablety **B** o 2 % se docílí pozvolnosti při uvolňování účinné látky, ale dochází k většímu rozptylu ve výsledcích, pro 6 tablet **A** RSD = 1,57% pro 6 tablet **B**

RSD = 20,50%. I při prodloužení času disoluce o 4 hodiny tablety **B**, nedocílíme stejné nebo alespoň přibližné koncentrace jako v případě tablety **A**. Výsledná koncentrace tablety **A** L-Trp v disolučním médiu byla 89,5 % (36 hodin), tablety **B** 68,4 % (40 hodin). Výhodou tablet **B** je skutečnost, že uvolňují menší množství účinné látky při pH 1 (žaludek), 0,01 %, než tableta **A**, 4,19 %.

3.2.4 Použité výpočty

Rovnice 5 - Vypočet %

$$\% = \frac{C_i}{215} \cdot 100$$

C_ikoncentrace jednotlivých vzorků v jednotlivých časech [mg/L]

215 mg.....celkové množství L – Trp v tabletách

Rovnice 6 - Výpočet % uvolněného L-Trp - korigováno na změnu objemu

$$\% = \left\{ \left[\left(\frac{Area - q}{k} \cdot V_1 \right) + \left[\left(\sum \frac{Area - q}{k} \right) \cdot V_2 \right] \right] \div C \right\} \cdot 100$$

V_1objem média v bodě odběru [L]

V_2objem odběru [L]

Ccílová koncentrace v tabletě [mg/L]

k, qsměrnice přímky

Rovnice 7 - Výpočet X

$$X = \frac{A_i - q_{\text{nizké;vysoké}}}{k_{\text{nizké;vysoké}}}$$

Aplocha píků jednotlivých vzorků [mV]

Rovnice 8 - Zředovací faktor (dilution factor)

$$DF = \frac{1000}{V_{akt.}}$$

V_{akt}aktuální objem disolučního roztoku [L]

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na disoluční testy perorálních lékových forem (tablet) s účinnou látkou L – tryptofan a stanovení jeho uvolněného množství v disolučním médiu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií HPLC.

V rámci experimentální části diplomové práce byla provedena validace analytické metody HPLC, která byla využita pro stanovení uvolněného množství L – tryptofanu z jednotlivých tablet. K tomuto účelu byl využit kapalinový chromatograf Shimadzu LC 2010C_{HT} s UV detekcí. Tato práce se zabývá popisem významu a principu disoluce, typů disolučních přístrojů a jejich konfigurací a popisem parametrů disoluční metody, které ovlivňují rozpustnost aktivních látek v disolučním médiu. Disoluční zkouška šesti tablet A a B v sedmi sériích měření byla provedena v disolučním roztoku simulující tekutinu gastrointestinálního traktu v pH 6,8 po dobu 26, 36 a 40 hodin. V rámci jednotlivých parametrů ovlivňujících rozpustnost látky L – Trp byla provedena změna typu a rychlosti míchacího zařízení. Rychlost míchání zařízení u experimentů s použitím pádel byla volena na 50, 75 a 100 rpm. Při použití drátěných košíčků byla zvolena rychlost 100 rpm. Vzorky tablet A a B s 6% a 8% přírůstkem hmotnosti tablety s vyraženým logem nejsou běžně dostupným produktem, vyskytují se ve fázi vývoje. Experimenty disolučních zkoušek byly provedeny na přístroji SOTAX AT XtendTM v polo – automatizovaném režimu.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit rozpustnost tablet s obsahem L – Trp v disolučním médiu, provést vizuální pozorování prostorových změn jednotlivých tablet a vyhodnotit disoluční profily z každého měření. Z disolučních profilů, které charakterizují uvolněné množství látky v závislosti na čase, bylo možné porovnat a zhodnotit vliv typu míchacího zařízení, rychlost míchání a také rozdíl v přírůstku hmotnosti tablet. Z hlediska typu míchacího zařízení pro dané tablety byla za vhodné vybrána metoda s použitím pádel. Při použití drátěných košů totiž docházelo k mechanickému poškození obalu tablety. Porovnáním rychlostí míchání pádel pro tablety A bylo zjištěno, že všechny disoluční profily při 50, 75 a 100 rpm umožňují uvolnění téměř stejného množství L – tryptofanu z tablety, tedy cca 187 mg látky z celkových 215 mg. U tablet B byl zjištěn rozdíl ve volbě rychlosti míchání pádel. Při rychlostech míchání vybraného zařízení 50 a 75 rpm se uvolnilo z tablety téměř shodné množství látky, cca 138 mg z celkových 215mg. Při rychlosti 100 rpm míchacího zařízení došlo k navýšení uvolněného množství na 178 mg z celkových 215 mg

L- Trp obsaženého v tabletě. Disoluční profily tablet **B** na rozdíl od disolučních profilů tablet **A** byly spíše lineární než strmě rostoucí. To vypovídá o větší vhodnosti tablet **B** z hlediska se zpožděným uvolňováním L – tryptofanu z tablety.

Dále bylo provedeno porovnání tablety **A** a **B** v závislosti jejich rozdílných přírůstků hmotnosti tablety při rychlosti míchání pádel 75 rpm. Zesílením obalu tablety **B** o 2% se docílilo pozvolného uvolnění účinné látky, ale došlo k uvolnění menšího množství L – Trp z tablety.

U tablety **A** bylo uvolněno 187 mg a u tablety **B** 146 mg z celkového množství 215 mg L – tryptofanu v tabletě. Výhodou tablet **B** je skutečnost, že uvolňují menší množství účinné látky při pH 1 (žaludek).

4. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GOWTHAMARAJAN, K. Dissolution Testing for Poorly Soluble Drugs: A Continuing Perspective. *Dissolution Technologies* [online]. 2010, **17**(3), 24-32 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.14227/DT170310P24. ISSN 1521298X. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201008Articles/DT201008_A04.pdf
- [2] NICKERSON, Beverly, Angela KONG, Paul GERST a Shangming KAO. Correlation of dissolution and disintegration results for an immediate-release tablet. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **150**, 333-340 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.017. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708517322768>
- [3] DVOŘÁČKOVÁ, Kateřina, Tereza BAUTZOVÁ a Miloslava RABIŠKOVÁ. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chemické listy* [online]. 2011, **105**(1), 50-54 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.upce.cz>
- [4] ABU REID, Imad. Development and Validation of Computer Spreadsheet Used to Calculate Dissolution Profiles without Media Replacement. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Analysis* [online]. 2017, **7**(1), 1-4 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.7439/ijapa.v7i1.4082. ISSN 2277-9353. Dostupné z: <http://ssjournals.com/index.php/ijapa/article/view/4082>
- [5] FOTAKI, Nikoletta. Flow-Through Cell Apparatus (USP Apparatus 4): Operation and Features. *Dissolution Technologies* [online]. 2011, **18**(4), 46-49 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.14227/DT180411P46. ISSN 1521298X. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201111Articles/DT201111_A06.pdf
- [6] SACCONI, Carlos, Julio TESSORE, Silvino OLIVERA a Nora MENECESES. Statistical Properties of the Dissolution Test of USP. *Dissolution Technologies* [online]. 2004, **11**(3), 25-28 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.14227/DT110304P25. ISSN 1521298X. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200408Articles/DT200408_A03.pdf
- [7] ROLLI, Rolf. Automation of dissolution tests. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry* [online]. 2003, **25**(3), 7-25 [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://apps.webofknowledge.com>
- [8] *Český lékopis 2009 (ČL 2009): Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. B. MMIX)* [CD-ROM]. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [9] SOTAX PAHRAMCEUTICAL TESTING S.R.O. *Návod k obsluze: Přístroj pro testy disoluce AT Xtend, firmware řady 2.2*. VÚOS a.s. Praha, b.r.

- [10] THE DISSOLUTION PROCEDURE: DEVELOPMENT AND VALIDATION. *The United States pharmacopeial Convention* [online]. s. 1-28 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: http://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/gc_1092.pdf
- [11] SOTAX. *Sotax* [online]. 2017 [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: www.sotax.com
- [12] KUME, Maiko, Paul CAREY, Gregory GAEHLE, Evelyn MADRID, Thomas VOLLER, William MARGENAU, Michael WELCH a Suzanne LAPI. A semi-automated system for the routine production of copper-64. *Applied Radiation and Isotopes* [online]. 2012, **70**(8), 1803-1806 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.apradiso.2012.03.009. ISSN 09698043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969804312002102>
- [13] O'HARA, Matthew, Anthony KRZYSKO, Cynthia NIVER, Samuel MORRISON, Stanley OWSLEY, Donald HAMLIN, Eric DORMAN a D. SCOTT WILBUR. An automated flow system incorporating in-line acid dissolution of bismuth metal from a cyclotron irradiated target assembly for use in the isolation of astatine-211. *Applied Radiation and Isotopes* [online]. 2017, **122**, 202-210 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.apradiso.2017.02.001. ISSN 09698043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969804316308831>
- [14] ADROVER, Alessandra, Augusta PEDACCHIA, Stefania PETRALITO a Romina SPERA. In vitro dissolution testing of oral thin films: A comparison between USP 1, USP 2 apparatuses and a new millifluidic flow-through device. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. 2015, **95**, 173-178 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.cherd.2014.10.020. ISSN 02638762. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876214004729>
- [15] ZHANG, Yiran, Gerard BRED AEL a Piero ARMENANTE. Dissolution of Prednisone Tablets in the Presence of an Arch-Shaped Fiber Optic Probe in a USP Dissolution Testing Apparatus 2. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **102**(8), 2718-2729 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1002/jps.23651. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915310042>
- [16] Dietary Supplements: DISINTEGRATION AND DISSOLUTION OF DIETARY SUPPLEMENTS. *The United States Pharmacopeial*. USA, 2017, s. 8178-8181.
- [17] LOONEY, Terry. USP Apparatus 4 (Flow-Through Method) Primer. *Dissolution Technologies* [online]. 1996, **3**(4), 10-12 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.14227/DT030496P10. ISSN 1521298X. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/1996Articles/DT199611_A03.pdf
- [18] D'ARCY, Deirdre, Bo LIU a Owen CORRIGAN. Investigating the effect of solubility and density gradients on local hydrodynamics and drug dissolution in the USP 4 dissolution apparatus. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, **419**(1-2), 175-185 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.048. ISSN 03785173.

- Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311007654>
- [19] JIRÁSKOVÁ, J., P. ONDREJČEK, T. WOLASCHKA, M. ŘEHULA a M. RABIŠKOVÁ. Aplikační možnosti disoluční metody s průtokovou celou. *Chemické listy* [online]. 2015, **109**(1), 34-40 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_01_34-40.pdf
- [20] KAŠPAR, Ondřej, Viola TOKÁROVÁ, Sarang OKA, Koushik SOWRIRAJAN, Rohit RAMACHANDRAN a František ŠTĚPÁNEK. Combined UV/vis and microtomography investigation of acetaminophen dissolution from granules. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **458**(2), 272-281 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.032. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313009186>
- [21] ALOBA, Olu, Debra BERGMAN, Robert MILLER a Robert DALY. Enhanced robotic dissolution system with concurrent off-line analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1993, **11**(10), 861-869 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/0731-7085(93)80042-Y. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/073170859380042Y>
- [22] SHAH, Vinod, James DEMUTH a Desmond HUNT. Performance Test for Parenteral Dosage Forms. *Dissolution Technologies* [online]. 2015, **22**(4), 16-21 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.14227/DT220415P16. ISSN 1521298X. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201511Articles/DT201511_A02.pdf
- [23] GITTINGS, Sally, Neil TURNBULL, Brian HENRY, Clive ROBERTS a Pavel GERSHKOVICH. Characterisation of human saliva as a platform for oral dissolution medium development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2015, **91**, 16-24 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.01.007. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641115000107>
- [24] ARIYASU, Aoi, Yusuke HATTORI a Makoto OTSUKA. Delay effect of magnesium stearate on tablet dissolution in acidic medium. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **511**(2), 757-764 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.07.034. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316306640>
- [25] HUANG, Zongyun, Shuchi PARIKH a William FISH. Interactions between a poorly soluble cationic drug and sodium dodecyl sulfate in dissolution medium and their impact on in vitro dissolution behavior. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, **535**(1-2), 350-359 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.063. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317310438>
- [26] GRAY, Vivian, Margareth C. MARQUES, Ewart COLE et al. Use of Enzymes in the Dissolution Testing of Gelatin Capsules and Gelatin-Coated Tablets-Revisions to

- Dissolution 711 and Disintegration and Dissolution of Dietary Supplements 2040. *Dissolution Technologies* [online]. 2014, **21**(4), 6-18 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.14227/DT210414P6. ISSN 1521298X. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201411Articles/DT201411_A01.pdf
- [27] ROZET, E., E. ZIEMONS, R.D. MARINI, B. BOULANGER a Ph. HUBERT. Validation of analytical methods involved in dissolution assays: Acceptance limits and decision methodologies. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, **751**, 44-51 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1016/j.aca.2012.09.017. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326701201344X>
- [28] PAUS, Raphael, Elena HART a Yuanhui JI. A novel approach for predicting the dissolution profiles of pharmaceutical tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2015, **96**, 53-64 [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.06.029. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964111500291X>
- [29] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. ISBN 3-527-30165-8.
- [30] SMITH, Roger. *Gas and liquid chromatography in analytical chemistry*. 1. Chichester: John Wiley & Sons, 1988. ISBN 0-471-90980-7.
- [31] *Český lékopis 1997: Pharmacopoea bohémica MCMXCVII : (Ph. B. XCVII)*. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-7169-625-0.
- [32] SHACKMAN, J.G. General Instrumentation. *Liquid Chromatography* [online]. Elsevier, 2013, s. 283-306 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415807-8.00013-4. ISBN 9780124158078. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158078000134>
- [33] GHOSH, Mantu K. *HPLC methods on drug analysis*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- [34] SAHU, Prafulla, Nageswara RAMISETTI, Teresa CECCHI, Suryakanta SWAIN, Chandra PATRO a Jagadeesh PANDA. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **147**, 590-611 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.006. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708517303746>
- [35] BIDLINGMEYER, Brian. *Practical HPLC methodology and applications*. New York: John Wiley & Sons, 1992. ISBN 0-471-57246-2.
- [36] DOLAN, J.W. a L.R. SNYDER. Method Development in Liquid Chromatography. *Liquid Chromatography* [online]. Elsevier, 2013, s. 251-267 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415807-8.00011-0. ISBN 9780124158078. Dostupné z:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158078000110>
- [37] NIKOLOVOVÁ, R. VÝZKUMNÝ ÚSTAV ORGANICKÝCH SYNTÉZ A.S. *Validace analytických metod: Standardní operační postup č. M/83/4*. VUOS Rybitví, 2014.
- [38] ARAUJO, Pedro. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(23), 2224-2234 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.09.030. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023208007265>
- [39] RUDAZ, Serge a Max FEINBERG. From Method Validation to Result Assessment: Established Facts and Pending Questions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, , - [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.trac.2018.04.013. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993618300797>
- [40] ÉPSHTEIN, N. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. 2004, **38**(4), 212-228 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1023/B:PHAC.0000038422.27193.6c. ISSN 0091-150X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:PHAC.0000038422.27193.6c>
- [41] ICH EXPERT WORKING GROUP, . Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. In: *The International Council for Harmonisation (ICH)* [online]. © The International Council for Harmonisation (ICH), 2015 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
- [42] MILLER, J. a J. MILLER. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 5th ed. New York: Pearson/Prentice Hall, 2005. ISBN 0-13-129192-0.
- [43] *HPLC.CZ* [online]. Česká Republika: Mgr. Michal Douša, Ph.D., 1999 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [44] OSTROVE, Steven. Terms and Definitions. *How to Validate a Pharmaceutical Process* [online]. London: Elsevier, 2016, s. 141-151 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/B978-0-12-804148-2.00024-X. ISBN 9780128041482. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012804148200024X>
- [45] ŠNAJDROVÁ, Aneta. *Vlastní fotografická dokumentace*. 2018.

5. PŘÍLOHY

Příloha A – Disoluce tablet A – 50 rpm

Příloha B – Disoluce tablet A – 75 rpm

Příloha C – Disoluce tablet A – 100 rpm

Příloha D – Disoluce tablet B – 50 rpm

Příloha E – Disoluce tablet B – 75 rpm

Příloha F – Disoluce tablet B -100 rpm

Příloha G – Disoluce tablet A – 100 rpm (košíčky)

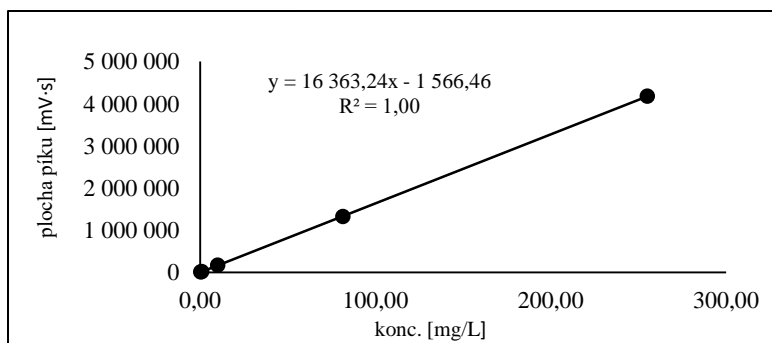
Příloha H – Ukázka chromatografu

Příloha A - Disoluce tablet A - 50 rpm

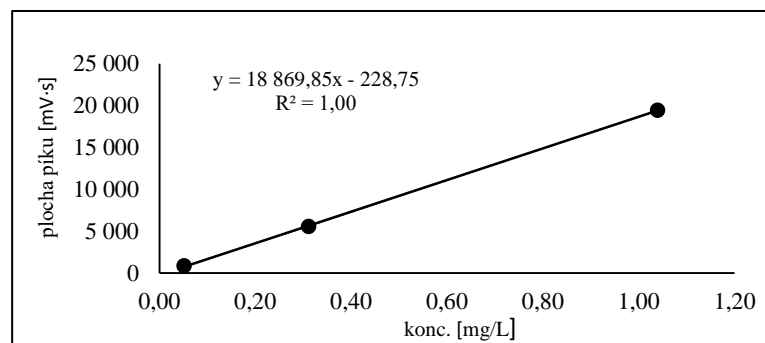
Plochy L - Trp

| hod | Plocha píku [mV·s] | | | | | | X | | | | | |
|-----|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | (A ₁ -q)/k | (A ₂ -q)/k | (A ₃ -q)/k | (A ₄ -q)/k | (A ₅ -q)/k | (A ₆ -q)/k |
| 2 | 4 751 | 135 003 | 48 554 | 37 364 | 137 086 | 179 185 | 0,26 | 8,35 | 3,06 | 2,38 | 8,47 | 11,05 |
| 2,5 | 9 017 | 147 159 | 65 634 | 39 570 | 131 329 | 184 236 | 0,49 | 9,09 | 4,11 | 2,51 | 8,12 | 11,36 |
| 4 | 66 892 | 280 408 | 133 977 | 99 755 | 314 723 | 265 650 | 4,18 | 17,23 | 8,28 | 6,19 | 19,33 | 16,33 |
| 5 | 244 646 | 510 134 | 281 320 | 200 593 | 585 548 | 425 550 | 15,05 | 31,27 | 17,29 | 12,35 | 35,88 | 26,10 |
| 6 | 489 129 | 724 001 | 525 020 | 400 852 | 870 613 | 642 585 | 29,99 | 44,34 | 32,18 | 24,59 | 53,30 | 39,37 |
| 7 | 718 528 | 909 808 | 768 409 | 634 687 | 1 093 414 | 843 484 | 44,01 | 55,70 | 47,06 | 38,88 | 66,92 | 51,64 |
| 8 | 894 235 | 1 085 875 | 976 609 | 844 217 | 1 282 554 | 989 567 | 54,75 | 66,46 | 59,78 | 51,69 | 78,48 | 60,57 |
| 10 | 1 179 109 | 1 380 151 | 1 304 214 | 1 182 084 | 1 583 555 | 1 272 091 | 72,16 | 84,44 | 79,80 | 72,34 | 96,87 | 77,84 |
| 15 | 1 656 396 | 1 878 590 | 1 886 132 | 1 742 558 | 2 156 928 | 1 876 197 | 101,32 | 114,90 | 115,36 | 106,59 | 131,91 | 114,76 |
| 20 | 2 021 191 | 2 243 768 | 2 341 313 | 2 144 261 | 2 559 568 | 2 286 691 | 123,62 | 137,22 | 143,18 | 131,14 | 156,52 | 139,84 |
| 26 | 2 431 626 | 2 612 266 | 2 797 242 | 2 542 423 | 2 896 112 | 2 685 146 | 148,70 | 159,74 | 171,04 | 155,47 | 177,09 | 164,19 |
| 30 | 2 597 840 | 2 750 573 | 2 965 409 | 2 710 688 | 3 010 252 | 2 835 274 | 158,86 | 168,19 | 181,32 | 165,76 | 184,06 | 173,37 |
| 33 | 2 699 771 | 2 833 330 | 3 068 289 | 2 809 990 | 3 060 574 | 2 919 265 | 165,09 | 173,25 | 187,61 | 171,82 | 187,14 | 178,50 |
| 36 | 2 780 778 | 2 904 094 | 3 134 766 | 2 902 577 | 3 099 550 | 2 998 192 | 170,04 | 177,58 | 191,67 | 177,48 | 189,52 | 183,33 |

Kalibrační řada I



Kalibrační řada II



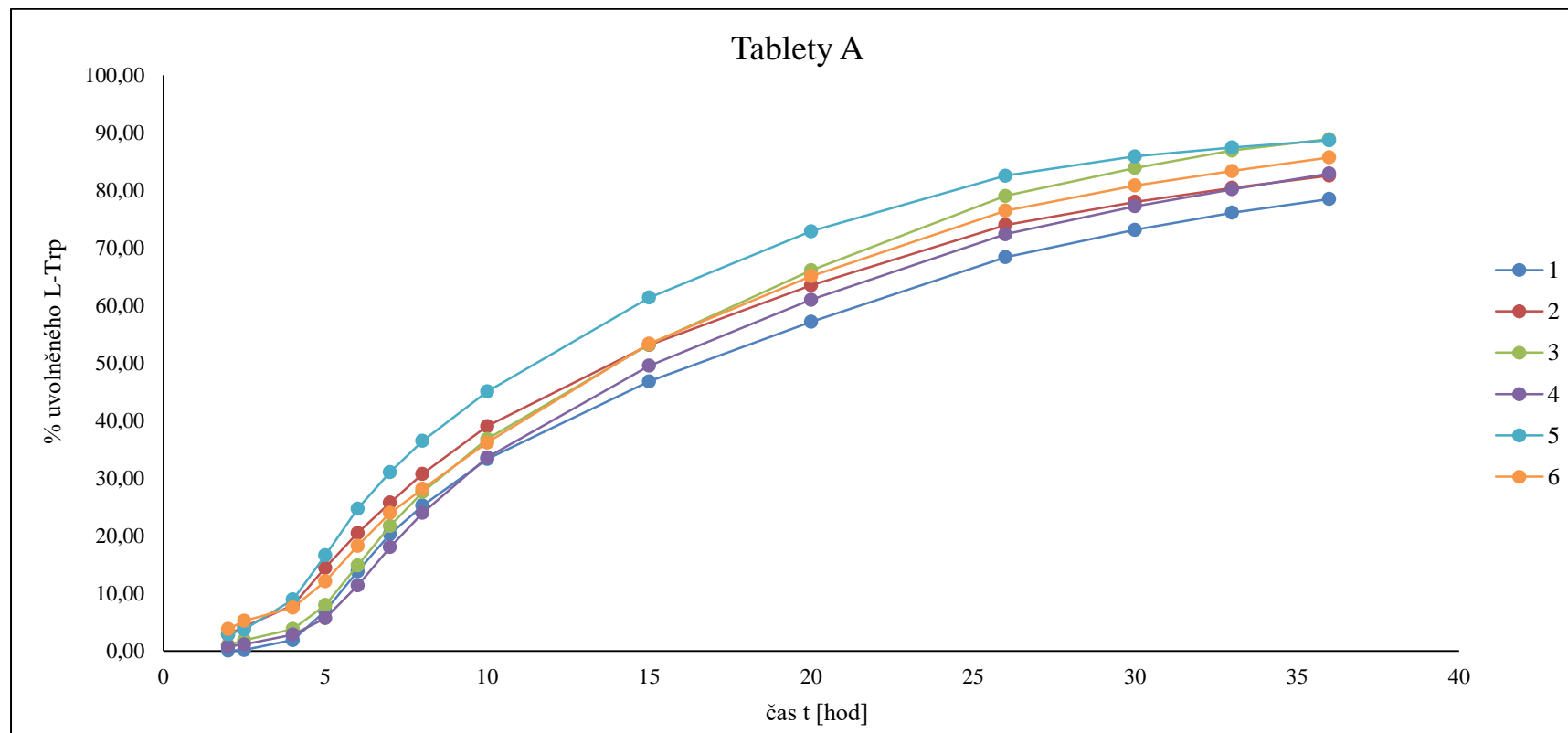
Koncentrace L-Trp

ve vzorcích

| Čas odběru vzorku od počátku | Koncentrace L-Trp ve vzorcích [mg/L] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|---------|--------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------------|------|--------------|
| | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | 4 ** | % | % korig. na změnu objemu | 5 ** | % | % korig. na změnu objemu | 6 ** | % | % korig. na změnu objemu | Průměr % | SD % | RSD % |
| 2 hod * | 0,35 | 0,16 | 0,09 | 11,13 | 5,17 | 2,91 | 4,08 | 1,90 | 1,07 | 3,17 | 1,47 | 0,83 | 11,30 | 5,25 | 2,96 | 14,73 | 6,85 | 3,85 | 1,95 | 1,36 | 69,50 |
| 2.5 hod | 2,84 | 1,32 | 0,23 | 9,11 | 4,24 | 4,23 | 4,12 | 1,91 | 1,91 | 2,52 | 1,17 | 1,17 | 8,14 | 3,79 | 3,78 | 11,38 | 5,29 | 5,28 | 2,77 | 1,79 | 64,71 |
| 4 hod | 4,20 | 1,95 | 1,94 | 17,28 | 8,04 | 8,00 | 8,31 | 3,86 | 3,85 | 6,21 | 2,89 | 2,87 | 19,39 | 9,02 | 8,98 | 16,38 | 7,62 | 7,59 | 5,54 | 2,74 | 49,45 |
| 5 hod | 15,12 | 7,03 | 6,97 | 31,43 | 14,62 | 14,50 | 17,37 | 8,08 | 8,02 | 12,42 | 5,77 | 5,74 | 36,06 | 16,77 | 16,66 | 26,23 | 12,20 | 12,13 | 10,67 | 4,04 | 37,84 |
| 6 hod | 30,17 | 14,03 | 13,88 | 44,61 | 20,75 | 20,55 | 32,37 | 15,06 | 14,90 | 24,74 | 11,51 | 11,42 | 53,62 | 24,94 | 24,77 | 39,60 | 18,42 | 18,30 | 17,30 | 4,46 | 25,77 |
| 7 hod | 44,36 | 20,63 | 20,35 | 56,14 | 26,11 | 25,79 | 47,43 | 22,06 | 21,77 | 39,19 | 18,23 | 18,06 | 67,45 | 31,37 | 31,12 | 52,06 | 24,21 | 24,02 | 23,52 | 4,20 | 17,87 |
| 8 hod | 55,24 | 25,69 | 25,30 | 67,05 | 31,19 | 30,79 | 60,32 | 28,05 | 27,63 | 52,15 | 24,26 | 24,03 | 79,18 | 36,83 | 36,53 | 61,12 | 28,43 | 28,20 | 28,75 | 4,09 | 14,23 |
| 10 hod | 72,95 | 33,93 | 33,36 | 85,37 | 39,71 | 39,08 | 80,68 | 37,52 | 36,85 | 73,13 | 34,01 | 33,64 | 97,94 | 45,55 | 45,11 | 78,69 | 36,60 | 36,25 | 37,38 | 3,97 | 10,61 |
| 15 hod | 102,54 | 47,69 | 46,86 | 116,28 | 54,08 | 53,18 | 1116,75 | 519,42 | 53,27 | 107,87 | 50,17 | 49,57 | 133,49 | 62,09 | 61,43 | 116,13 | 54,01 | 53,42 | 52,96 | 4,49 | 8,47 |
| 20 hod | 125,35 | 58,30 | 57,20 | 139,14 | 64,72 | 63,55 | 145,18 | 67,53 | 66,15 | 132,97 | 61,85 | 61,03 | 158,71 | 73,82 | 72,93 | 141,80 | 65,95 | 65,13 | 64,33 | 4,83 | 7,51 |
| 26 hod | 150,93 | 70,20 | 68,44 | 162,13 | 75,41 | 74,03 | 173,61 | 80,75 | 79,08 | 157,80 | 73,40 | 72,41 | 179,74 | 83,60 | 82,58 | 166,66 | 77,51 | 76,52 | 75,51 | 4,57 | 6,06 |
| 30 hod | 161,56 | 75,14 | 73,19 | 171,05 | 79,56 | 78,03 | 184,40 | 85,77 | 83,93 | 168,57 | 78,41 | 77,29 | 187,19 | 87,06 | 85,93 | 176,31 | 82,01 | 80,89 | 79,88 | 4,26 | 5,33 |
| 33 hod | 168,06 | 78,17 | 76,16 | 176,37 | 82,03 | 80,48 | 190,98 | 88,83 | 86,95 | 174,91 | 81,36 | 80,22 | 190,50 | 88,61 | 87,49 | 181,71 | 84,52 | 83,39 | 82,45 | 3,98 | 4,82 |
| 36 hod | 173,44 | 80,67 | 78,54 | 181,12 | 84,24 | 82,60 | 195,50 | 90,93 | 88,95 | 181,03 | 84,20 | 82,96 | 193,31 | 89,91 | 88,72 | 186,99 | 86,97 | 85,75 | 84,59 | 3,67 | 4,33 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

Disoluční profily

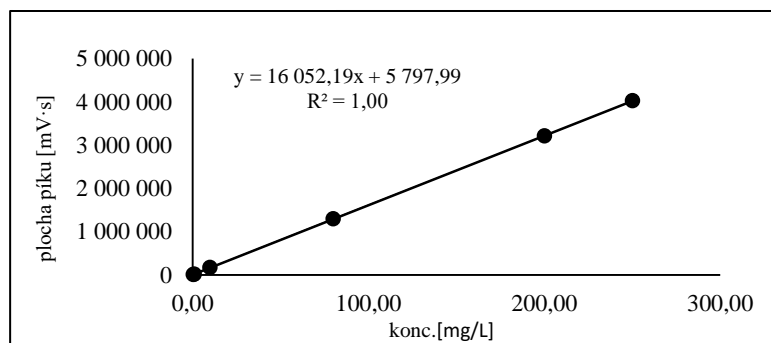


Příloha B - Disoluce tablet A - 75 rpm

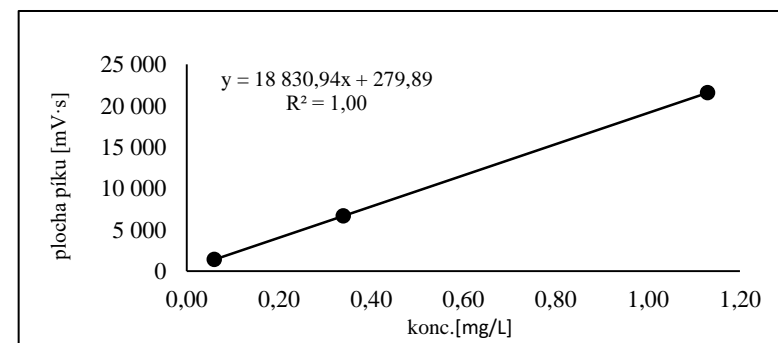
Plochy L-Trp

| hod | Plocha piků [mV·s] | | | | | | X | | | | | |
|-----|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | (A ₁ -q)/k | (A ₂ -q)/k | (A ₃ -q)/k | (A ₄ -q)/k | (A ₅ -q)/k | (A ₆ -q)/k |
| 2 | 49 301 | 76 637 | 254 857 | 279 535 | 235 074 | 271 721 | 2,97 | 4,67 | 15,77 | 17,31 | 14,54 | 16,83 |
| 2,5 | 56 058 | 188 220 | 294 821 | 303 960 | 336 241 | 529 509 | 3,39 | 11,62 | 18,26 | 18,83 | 20,85 | 32,89 |
| 4 | 367 245 | 801 620 | 768 570 | 1 035 509 | 930 278 | 1 155 115 | 22,78 | 49,84 | 47,78 | 64,42 | 57,86 | 71,87 |
| 5 | 734 369 | 1 201 086 | 1 057 021 | 1 478 083 | 1 282 060 | 1 546 881 | 45,65 | 74,73 | 65,76 | 91,99 | 79,78 | 96,28 |
| 6 | 1 141 678 | 1 648 164 | 1 405 020 | 1 962 188 | 1 651 740 | 1 898 507 | 70,76 | 102,32 | 87,17 | 121,88 | 102,54 | 117,91 |
| 7 | 1 382 166 | 1 894 983 | 1 584 131 | 2 182 829 | 1 805 579 | 2 061 076 | 85,74 | 117,69 | 98,33 | 135,62 | 112,12 | 128,04 |
| 8 | 1 583 509 | 2 053 127 | 1 775 048 | 2 380 433 | 1 925 389 | 2 195 661 | 98,29 | 127,54 | 110,22 | 147,93 | 119,59 | 136,42 |
| 10 | 1 948 159 | 2 369 856 | 2 137 421 | 2 711 457 | 2 118 940 | 2 438 845 | 121,00 | 147,27 | 132,79 | 168,56 | 131,64 | 151,57 |
| 15 | 2 984 190 | 2 984 483 | 3 122 501 | 2 997 392 | 2 456 812 | 2 997 935 | 185,55 | 185,56 | 194,16 | 186,37 | 152,69 | 186,40 |
| 20 | 3 014 966 | 2 970 773 | 3 111 448 | 2 990 887 | 2 675 495 | 2 982 432 | 187,46 | 184,71 | 193,47 | 185,96 | 166,32 | 185,44 |
| 26 | 3 004 623 | 2 959 595 | 3 105 180 | 2 986 750 | 2 860 504 | 2 978 014 | 186,82 | 184,01 | 193,08 | 185,71 | 177,84 | 185,16 |
| 30 | 3 098 599 | 3 053 747 | 3 203 360 | 3 083 167 | 3 041 315 | 3 070 232 | 192,67 | 189,88 | 199,20 | 191,71 | 189,11 | 190,91 |
| 33 | 3 082 880 | 3 036 387 | 3 188 774 | 3 071 470 | 3 081 525 | 3 055 800 | 191,69 | 188,80 | 198,29 | 190,98 | 191,61 | 190,01 |
| 36 | 3 070 187 | 3 025 641 | 3 177 220 | 3 064 281 | 3 105 787 | 3 042 373 | 190,90 | 188,13 | 197,57 | 190,54 | 193,12 | 189,17 |

Kalibrační řada I



Kalibrační řada II

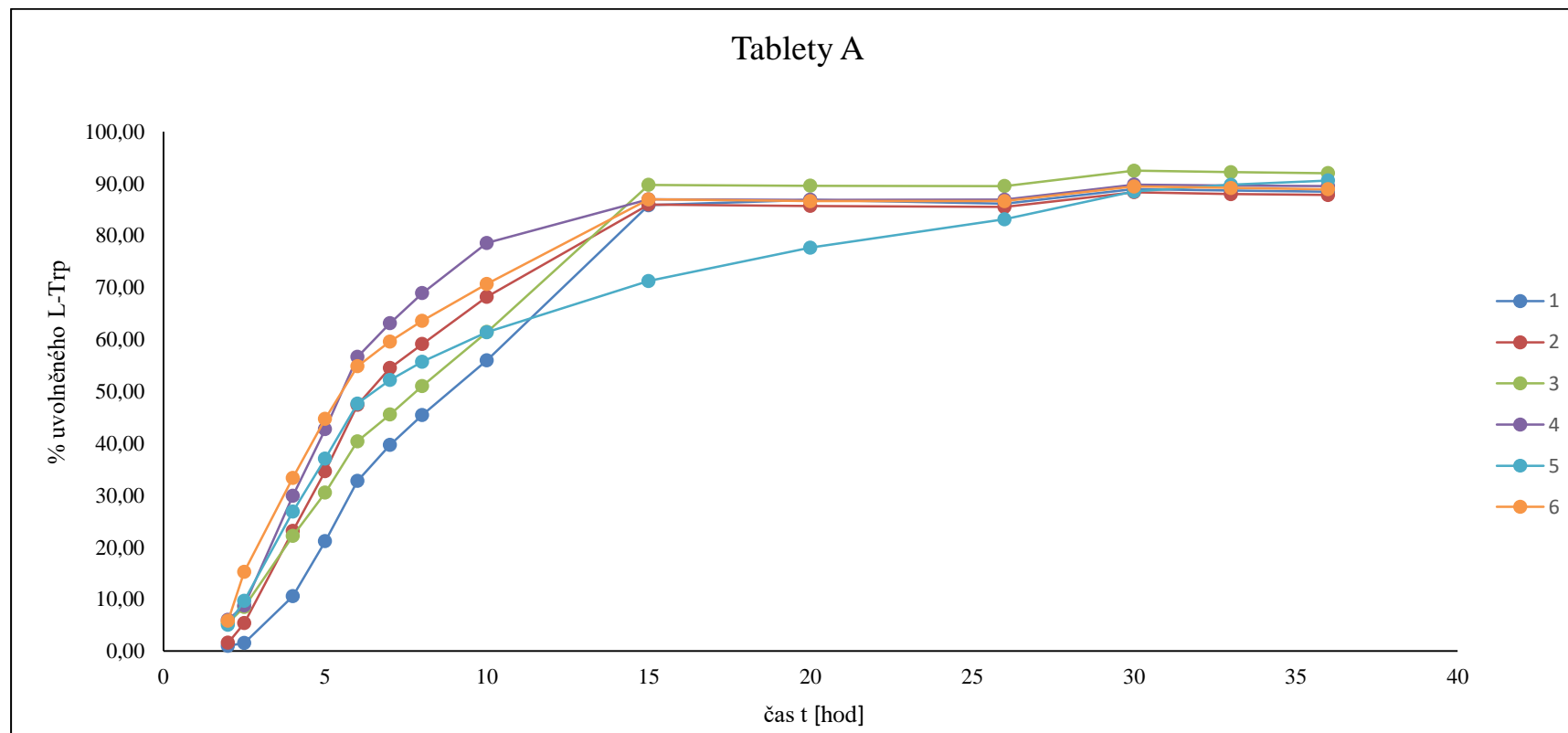


Koncentrace L-Trp ve vzorcích

| Čas odběru vzorku od počátku | Koncentrace L-Trp ve vzorcích [mg/L] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------------|------|--------------|
| | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | 4 ** | % | % korig. na změnu objemu | 5 ** | % | % korig. na změnu objemu | 6 ** | % | % korig. na změnu objemu | Průměr % | SD % | RSD % |
| 2 hod* | 3,96 | 1,84 | 1,03 | 6,23 | 2,90 | 1,63 | 21,03 | 9,78 | 5,50 | 23,08 | 10,73 | 6,04 | 19,39 | 9,02 | 5,07 | 22,43 | 10,43 | 5,87 | 4,19 | 2,05 | 48,95 |
| 2.5 hod | 3,40 | 1,58 | 1,58 | 11,65 | 5,42 | 5,40 | 18,30 | 8,51 | 8,49 | 18,87 | 8,78 | 8,76 | 20,89 | 9,71 | 9,69 | 32,95 | 15,33 | 15,29 | 8,20 | 4,17 | 50,90 |
| 4 hod | 22,85 | 10,63 | 10,57 | 49,99 | 23,25 | 23,12 | 47,93 | 22,29 | 22,18 | 64,61 | 30,05 | 29,90 | 58,03 | 26,99 | 26,86 | 72,08 | 33,53 | 33,36 | 24,33 | 7,24 | 29,75 |
| 5 hod | 45,88 | 21,34 | 21,16 | 75,11 | 34,93 | 34,65 | 66,08 | 30,74 | 30,50 | 92,45 | 43,00 | 42,73 | 80,18 | 37,29 | 37,06 | 96,76 | 45,00 | 44,73 | 35,14 | 7,86 | 22,36 |
| 6 hod | 71,19 | 33,11 | 32,77 | 102,30 | 47,58 | 47,40 | 87,69 | 40,79 | 40,40 | 122,61 | 57,03 | 56,65 | 103,15 | 47,98 | 47,67 | 118,62 | 55,17 | 54,83 | 46,62 | 8,17 | 17,52 |
| 7 hod | 86,43 | 40,20 | 39,68 | 118,63 | 55,18 | 54,50 | 99,11 | 46,10 | 45,55 | 136,71 | 63,58 | 63,11 | 113,02 | 52,57 | 52,19 | 129,06 | 60,03 | 59,61 | 52,44 | 7,96 | 15,17 |
| 8 hod | 99,17 | 46,13 | 45,47 | 128,69 | 59,86 | 59,13 | 111,21 | 51,73 | 51,04 | 149,26 | 69,43 | 68,91 | 120,66 | 56,12 | 55,72 | 137,65 | 64,02 | 63,59 | 57,31 | 7,74 | 13,51 |
| 10 hod | 122,33 | 56,90 | 56,00 | 148,89 | 69,25 | 68,22 | 134,25 | 62,44 | 61,43 | 170,41 | 79,26 | 78,58 | 133,09 | 61,90 | 61,40 | 153,24 | 71,27 | 70,71 | 66,06 | 7,39 | 11,18 |
| 15 hod | 187,77 | 87,34 | 85,84 | 187,79 | 87,34 | 85,98 | 196,49 | 91,39 | 89,76 | 188,60 | 87,72 | 86,96 | 154,52 | 71,87 | 71,25 | 188,64 | 87,74 | 86,96 | 84,46 | 6,05 | 7,16 |
| 20 hod | 190,09 | 88,41 | 86,85 | 187,29 | 87,11 | 85,71 | 196,18 | 91,25 | 89,58 | 188,57 | 87,70 | 86,90 | 168,64 | 78,44 | 77,67 | 188,03 | 87,46 | 86,65 | 85,56 | 3,72 | 4,35 |
| 26 hod | 189,62 | 88,19 | 86,16 | 186,77 | 86,87 | 85,52 | 195,98 | 91,15 | 89,54 | 188,49 | 87,67 | 86,91 | 180,51 | 83,96 | 83,14 | 187,94 | 87,41 | 86,65 | 86,32 | 1,90 | 2,20 |
| 30 hod | 188,13 | 87,50 | 88,98 | 185,31 | 86,19 | 88,35 | 194,72 | 90,57 | 92,49 | 187,16 | 87,05 | 89,83 | 184,53 | 85,83 | 88,48 | 186,35 | 86,67 | 89,44 | 89,59 | 1,39 | 1,55 |
| 33 hod | 187,24 | 87,09 | 88,66 | 184,40 | 85,77 | 87,99 | 194,00 | 90,23 | 92,21 | 186,61 | 86,79 | 89,62 | 187,24 | 87,09 | 89,78 | 185,62 | 86,33 | 89,16 | 89,57 | 1,32 | 1,48 |
| 36 hod | 186,89 | 86,93 | 88,43 | 184,08 | 85,62 | 87,81 | 193,65 | 90,07 | 92,01 | 186,52 | 86,75 | 89,55 | 189,14 | 87,97 | 90,61 | 185,14 | 86,11 | 88,90 | 89,55 | 1,41 | 1,57 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

Disoluční profily



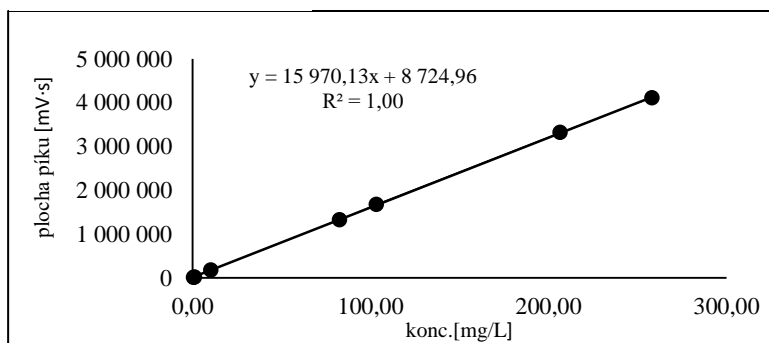
Příloha C - Disoluce tablet A – 100 rpm

Plochy L-Trp

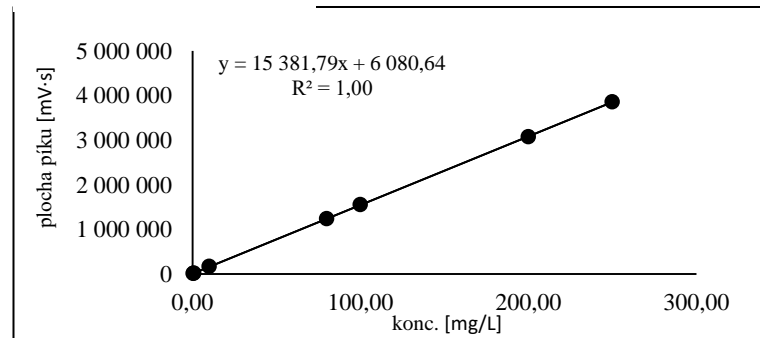
| hod | Plocha píků [mV·s] | | | X | | |
|-----|--------------------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | (A ₁ -q)/k | (A ₂ -q)/k | (A ₃ -q)/k |
| 2 | 50 519 | 89 713 | 259 269 | 2,62 | 5,07 | 15,69 |
| 2,5 | 47 258 | 93 929 | 270 713 | 2,41 | 5,34 | 16,41 |
| 4 | 100 828 | 319 241 | 616 633 | 5,77 | 19,44 | 38,07 |
| 5 | 268 483 | 701 172 | 1 021 975 | 16,27 | 43,36 | 63,45 |
| 6 | 470 988 | 1 036 877 | 1 303 449 | 28,95 | 64,38 | 81,07 |
| 7 | 693 440 | 1 276 161 | 1 488 317 | 42,88 | 79,36 | 92,65 |
| 8 | 897 250 | 1 454 920 | 1 631 302 | 55,64 | 90,56 | 101,60 |
| 10 | 1 248 725 | 1 796 979 | 1 874 089 | 77,65 | 111,98 | 116,80 |
| 15 | 1 783 460 | 2 955 967 | 2 304 402 | 111,13 | 184,55 | 143,75 |
| 20 | 2 128 785 | 3 046 902 | 2 555 409 | 132,75 | 190,24 | 159,47 |
| 26 | 2 538 886 | 3 172 061 | 3 153 398 | 158,43 | 198,08 | 196,91 |
| 30 | 2 695 056 | 3 152 082 | 3 143 302 | 168,21 | 196,83 | 196,28 |
| 33 | 2 822 026 | 3 135 342 | 3 125 769 | 176,16 | 195,78 | 195,18 |
| 36 | 2 913 058 | 3 121 670 | 3 112 438 | 181,86 | 194,92 | 194,35 |

Data pouze pro 3 tablety

Kalibrační řada I



Kalibrační řada II



Koncentrace L-Trp

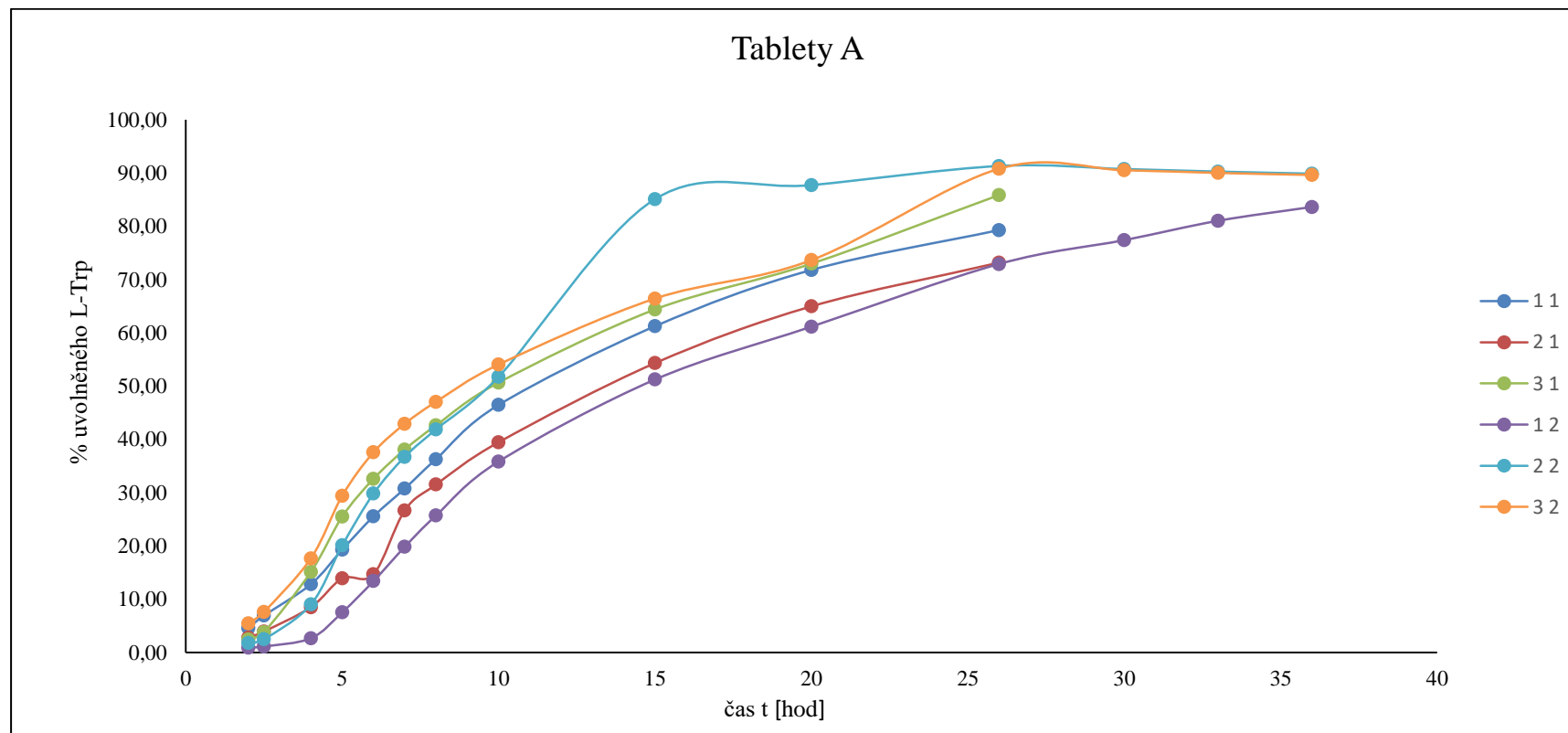
ve vzorcích

| Čas odběru vzorku od počátku | Koncentrace L-Trp ve vzorcích [mg/L] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------------|-------|--------------|
| | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | Průměr % | SD % | RSD % |
| 2 hod * | 3,49 | 1,62 | 0,91 | 6,76 | 3,14 | 1,77 | 20,91 | 9,73 | 5,47 | 17,59 | 8,18 | 4,60 | 10,59 | 4,92 | 2,77 | 9,38 | 4,36 | 2,45 | 3,00 | 1,58 | 52,59 |
| 2.5 hod | 2,42 | 1,12 | 1,12 | 5,35 | 2,49 | 2,48 | 16,44 | 7,65 | 7,63 | 14,91 | 6,94 | 6,92 | 8,50 | 3,95 | 3,94 | 8,27 | 3,85 | 3,84 | 4,32 | 2,30 | 53,18 |
| 4 hod | 5,79 | 2,69 | 2,68 | 19,50 | 9,07 | 9,02 | 38,18 | 17,76 | 17,67 | 27,70 | 12,88 | 12,82 | 18,38 | 8,55 | 8,51 | 32,73 | 15,22 | 15,14 | 10,97 | 4,91 | 44,70 |
| 5 hod | 16,35 | 7,60 | 7,54 | 43,58 | 20,27 | 20,10 | 63,76 | 29,66 | 29,43 | 41,81 | 19,45 | 19,30 | 30,12 | 14,01 | 13,90 | 55,28 | 25,71 | 25,50 | 19,29 | 7,18 | 37,20 |
| 6 hod | 29,12 | 13,54 | 13,40 | 64,77 | 30,12 | 29,82 | 81,56 | 37,93 | 37,57 | 55,44 | 25,79 | 25,55 | 44,91 | 20,89 | 14,67 | 70,78 | 32,92 | 32,60 | 25,60 | 8,93 | 34,88 |
| 7 hod | 43,22 | 20,10 | 19,83 | 80,00 | 37,21 | 36,73 | 93,39 | 43,44 | 42,92 | 66,97 | 31,15 | 30,78 | 58,09 | 27,02 | 26,67 | 82,91 | 38,56 | 38,09 | 32,50 | 7,69 | 23,67 |
| 8 hod | 56,14 | 26,11 | 25,71 | 91,37 | 42,50 | 41,89 | 102,52 | 47,68 | 47,05 | 79,11 | 36,80 | 36,29 | 68,76 | 31,98 | 31,52 | 92,92 | 43,22 | 42,63 | 37,51 | 7,22 | 19,25 |
| 10 hod | 78,50 | 36,51 | 35,84 | 113,21 | 52,65 | 51,75 | 118,09 | 54,92 | 54,04 | 101,64 | 47,28 | 46,47 | 86,35 | 40,16 | 39,46 | 110,77 | 51,52 | 50,66 | 46,37 | 6,64 | 14,33 |
| 15 hod | 112,46 | 52,31 | 51,23 | 186,76 | 86,87 | 85,10 | 145,47 | 67,66 | 66,42 | 134,29 | 62,46 | 61,24 | 119,16 | 55,42 | 54,31 | 141,11 | 65,63 | 64,38 | 63,78 | 10,92 | 17,12 |
| 20 hod | 134,16 | 62,40 | 61,15 | 192,91 | 89,72 | 87,71 | 161,70 | 75,21 | 73,64 | 157,93 | 73,45 | 71,79 | 142,96 | 66,49 | 64,96 | 160,42 | 74,61 | 72,97 | 72,04 | 8,34 | 11,58 |
| 26 hod | 160,81 | 74,79 | 72,92 | 201,05 | 93,51 | 91,30 | 199,86 | 92,96 | 90,79 | 175,18 | 81,48 | 79,28 | 161,77 | 75,24 | 73,17 | 189,67 | 88,22 | 85,85 | 82,22 | 7,60 | 9,24 |
| 30 hod | 171,07 | 79,57 | 77,39 | 200,17 | 93,10 | 90,73 | 199,62 | 92,84 | 90,50 | - | - | | - | - | | - | - | | 86,21 | 6,24 | 7,23 |
| 33 hod | 179,33 | 83,41 | 81,02 | 199,30 | 92,70 | 90,25 | 198,69 | 92,42 | 90,00 | - | - | | - | - | | - | - | | 87,09 | 4,29 | 4,93 |
| 36 hod | 185,50 | 86,28 | 83,62 | 198,82 | 92,48 | 89,86 | 198,23 | 92,20 | 89,62 | - | - | | - | - | | - | - | | 87,70 | 2,89 | 3,29 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

Časový průběh tablet (26 hod, 36 hod) disoluční zkoušky při rychlosti otáčení 100 rpm se liší kvůli změně požadavku klienta. Byly provedeny dva experimenty.

Disoluční profily

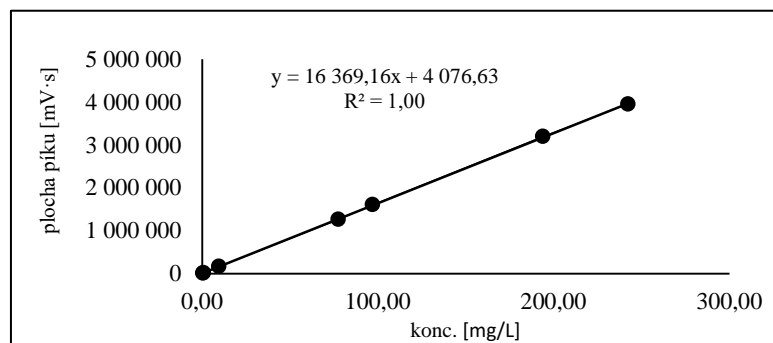


Příloha D - Disoluce tablet B – 50 rpm

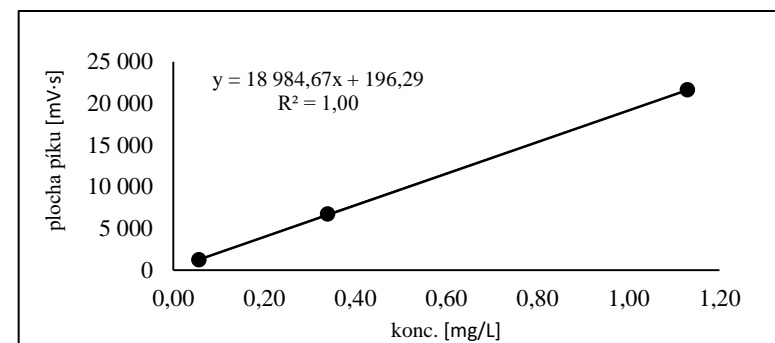
Plochy L-Trp

| hod | Plocha píků [mV·s] | | | | | | X | | | | | |
|-----|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | (A ₁ -q)/k | (A ₂ -q)/k | (A ₃ -q)/k | (A ₄ -q)/k | (A ₅ -q)/k | (A ₆ -q)/k |
| 2 | 2195 | 4744 | 31 482 | 4 189 | 67 449 | 3 480 | 0,11 | 0,24 | 1,67 | 0,21 | 3,54 | 0,17 |
| 2,5 | 0 | 0 | 31 004 | 1 509 | 64 391 | 1 943 | -0,01 | -0,01 | 1,64 | 0,07 | 3,68 | 0,09 |
| 4 | 3 228 | 0 | 43 596 | 2 547 | 91 208 | 4 302 | 0,16 | -0,01 | 2,41 | 0,12 | 5,32 | 0,22 |
| 5 | 33 447 | 1 616 | 55 042 | 11 760 | 118 810 | 6 573 | 1,79 | 0,07 | 3,11 | 0,47 | 7,01 | 0,34 |
| 6 | 113 791 | 3 444 | 71 877 | 36 656 | 152 996 | 9 559 | 6,70 | 0,17 | 4,14 | 1,99 | 9,10 | 0,49 |
| 7 | 219 458 | 9 345 | 98 089 | 71 586 | 195 862 | 12 980 | 13,16 | 0,48 | 5,74 | 4,12 | 11,72 | 0,54 |
| 8 | 350 560 | 26 165 | 133 596 | 115 819 | 255 525 | 44 050 | 21,17 | 1,35 | 7,91 | 6,83 | 15,36 | 2,44 |
| 10 | 661 726 | 114 691 | 235 352 | 231 406 | 452 365 | 95 107 | 40,18 | 6,76 | 14,13 | 13,89 | 27,39 | 5,56 |
| 15 | 1 229 155 | 496 591 | 685 553 | 733 288 | 1 058 803 | 225 313 | 74,84 | 30,09 | 41,63 | 44,55 | 64,43 | 13,52 |
| 20 | 1 602 053 | 1 020 824 | 1 221 582 | 1 265 290 | 1 568 134 | 397 574 | 97,62 | 62,11 | 74,38 | 77,05 | 95,55 | 24,04 |
| 26 | 2 012 336 | 1 575 925 | 1 768 337 | 1 806 241 | 2 050 644 | 699 408 | 122,69 | 96,03 | 107,78 | 110,10 | 125,03 | 42,48 |
| 30 | 2 186 165 | 1 819 058 | 2 002 297 | 2 034 943 | 2 255 906 | 923 603 | 133,31 | 110,88 | 122,07 | 124,07 | 137,57 | 56,17 |
| 33 | 2 299 413 | 1 976 883 | 2 152 080 | 2 182 327 | 2 384 345 | 1 107 579 | 140,22 | 120,52 | 131,22 | 133,07 | 145,41 | 67,41 |
| 36 | 2 401 990 | 2 116 000 | 2 283 998 | 2 311 213 | 2 497 276 | 1 326 140 | 146,49 | 129,02 | 139,28 | 140,95 | 152,31 | 80,77 |

Kalibrační řada I



Kalibrační řada II

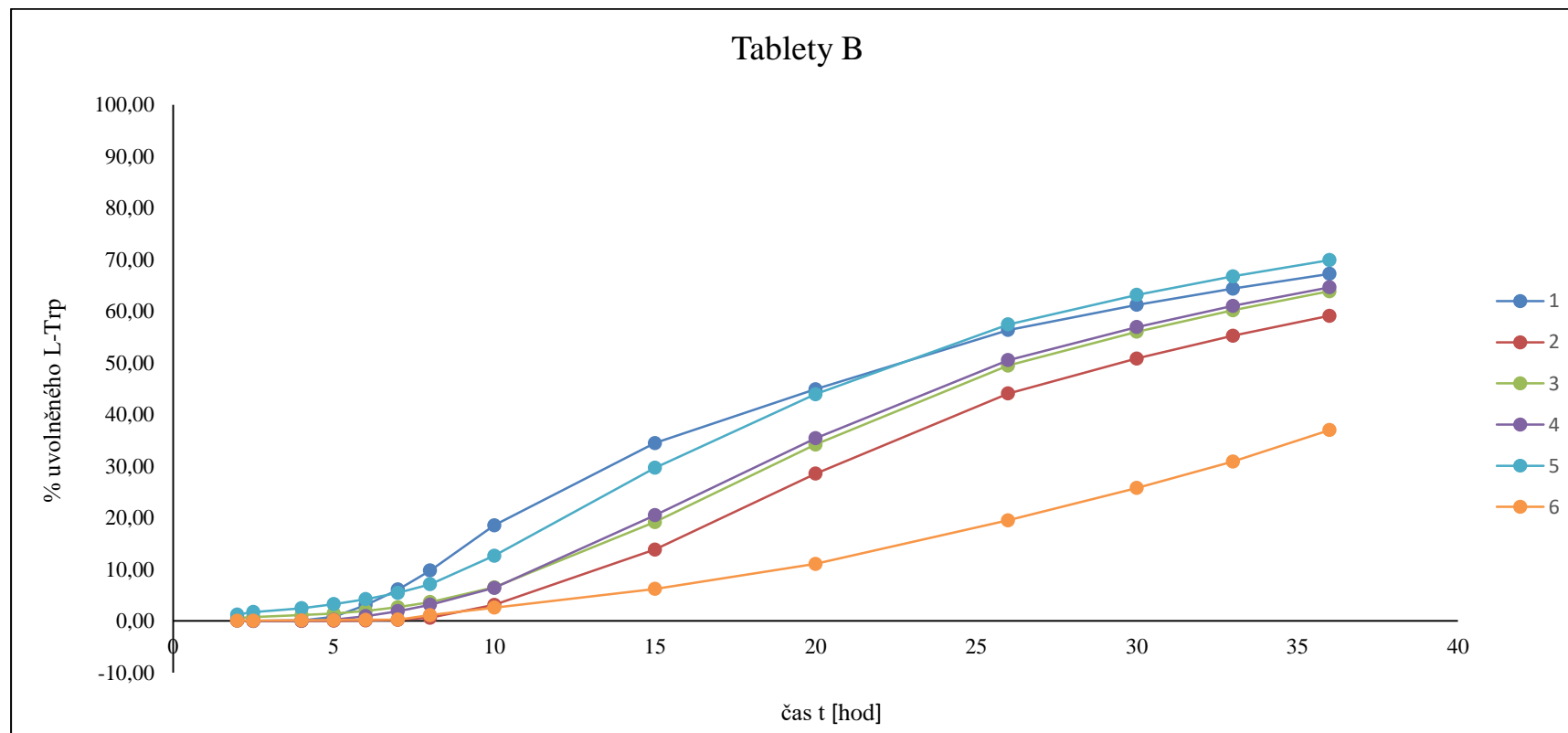


Koncentrace L-Trp ve vzorcích

| Čas odběru vzorku od počátku | Koncentrace L-Trp ve vzorcích [mg/L] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|-------|-------|--------------------------|--------------|-------|---------------|
| | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | 4 ** | % | % korig. na změnu objemu | 5 ** | % | % korig. na změnu objemu | 6 ** | % | % korig. na změnu objemu | Průměr % | SD % | RSD % |
| 2 hod * | 0,11 | 0,05 | 0,04 | 0,32 | 0,15 | 0,08 | 2,23 | 1,04 | 0,58 | 0,28 | 0,13 | 0,07 | 4,72 | 2,20 | 1,24 | 0,23 | 0,11 | 0,06 | 0,35 | 0,44 | 127,69 |
| 2.5 hod | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,65 | 0,77 | 0,77 | 0,07 | 0,03 | 0,03 | 3,69 | 1,72 | 1,71 | 0,09 | 0,04 | 0,04 | 0,42 | 0,64 | 150,56 |
| 4 hod | 0,16 | 0,07 | 0,07 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,42 | 1,13 | 1,12 | 0,12 | 0,06 | 0,06 | 5,34 | 2,48 | 2,47 | 0,22 | 0,10 | 0,10 | 0,64 | 0,91 | 142,70 |
| 5 hod | 1,80 | 0,84 | 0,83 | 0,08 | 0,03 | 0,03 | 3,13 | 1,46 | 1,45 | 0,47 | 0,22 | 0,22 | 7,04 | 3,28 | 3,25 | 0,34 | 0,16 | 0,16 | 0,99 | 1,12 | 113,44 |
| 6 hod | 6,74 | 3,14 | 3,10 | 0,17 | 0,08 | 0,08 | 4,17 | 1,94 | 1,92 | 2,00 | 0,93 | 0,92 | 9,15 | 4,26 | 4,22 | 0,50 | 0,23 | 0,23 | 1,74 | 1,51 | 86,74 |
| 7 hod | 13,26 | 6,17 | 6,08 | 0,49 | 0,23 | 0,22 | 5,79 | 2,69 | 2,66 | 4,16 | 1,93 | 1,91 | 11,81 | 5,49 | 5,43 | 0,55 | 0,25 | 0,25 | 2,76 | 2,30 | 83,22 |
| 8 hod | 21,36 | 9,93 | 9,77 | 1,36 | 0,63 | 0,62 | 7,98 | 3,71 | 3,66 | 6,89 | 3,20 | 3,15 | 15,50 | 7,21 | 7,11 | 2,46 | 1,15 | 1,13 | 4,24 | 3,24 | 76,50 |
| 10 hod | 40,62 | 18,89 | 18,52 | 6,83 | 3,18 | 3,11 | 14,28 | 6,64 | 6,52 | 14,04 | 6,53 | 6,40 | 27,69 | 12,88 | 12,64 | 5,62 | 2,61 | 2,56 | 8,29 | 5,63 | 67,84 |
| 15 hod | 75,74 | 35,23 | 34,45 | 30,45 | 14,16 | 13,83 | 42,13 | 19,60 | 19,16 | 45,08 | 20,97 | 20,49 | 65,21 | 30,33 | 29,67 | 13,68 | 6,36 | 6,22 | 20,64 | 9,39 | 45,49 |
| 20 hod | 98,99 | 46,04 | 44,90 | 62,98 | 29,29 | 28,53 | 75,42 | 35,08 | 34,19 | 78,13 | 36,34 | 35,40 | 96,89 | 45,06 | 43,94 | 24,38 | 11,34 | 11,05 | 33,00 | 11,33 | 34,34 |
| 26 hod | 124,53 | 57,92 | 56,39 | 97,47 | 45,33 | 44,06 | 109,40 | 50,88 | 49,49 | 111,75 | 51,97 | 50,54 | 126,90 | 59,02 | 57,45 | 43,12 | 20,05 | 19,49 | 46,24 | 12,77 | 27,61 |
| 30 hod | 135,57 | 63,06 | 61,24 | 112,76 | 52,45 | 50,86 | 124,15 | 57,74 | 56,03 | 126,18 | 58,69 | 56,93 | 139,90 | 65,07 | 63,19 | 57,09 | 26,55 | 25,76 | 52,33 | 12,52 | 23,92 |
| 33 hod | 142,75 | 66,39 | 64,40 | 122,69 | 57,06 | 55,26 | 133,59 | 62,13 | 60,21 | 135,47 | 63,01 | 61,05 | 148,03 | 68,85 | 66,77 | 68,63 | 31,92 | 30,89 | 56,43 | 11,97 | 21,21 |
| 36 hod | 149,42 | 69,50 | 67,26 | 131,60 | 61,21 | 59,14 | 142,07 | 66,08 | 63,88 | 143,76 | 66,87 | 64,64 | 155,36 | 72,26 | 69,92 | 82,38 | 38,32 | 36,98 | 60,30 | 10,94 | 18,14 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

Disoluční profily

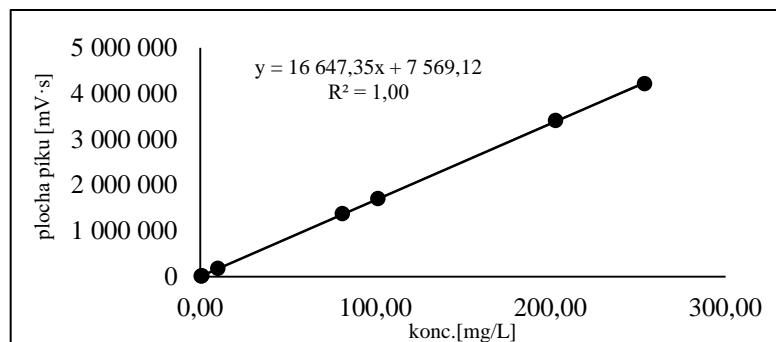


Příloha E - Disoluce tablet B – 75 rpm

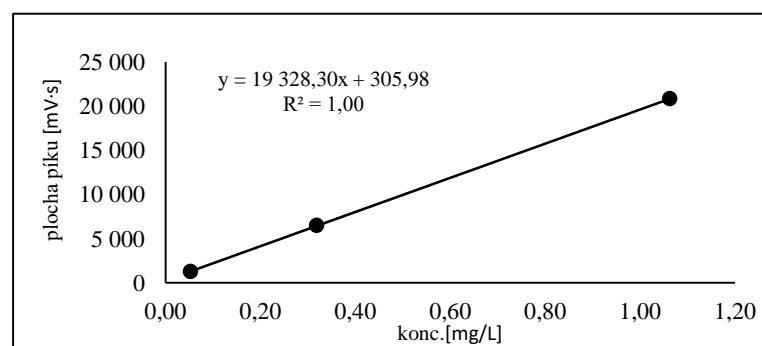
Plochy L - Trp

| hod | Plocha píků [mV·s] | | | | | | X | | | | | |
|-----|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | (A ₁ -q)/k | (A ₂ -q)/k | (A ₃ -q)/k | (A ₄ -q)/k | (A ₅ -q)/k | (A ₆ -q)/k |
| 2 | N.A. | 0 | 0 | 1 931 | 0 | 3 771 | 0,00 | -0,02 | -0,02 | 0,08 | -0,02 | 0,18 |
| 2,5 | 71 499 | 0 | 0 | 4 799 | 0 | 7 328 | 3,68 | -0,02 | -0,02 | 0,23 | -0,02 | 0,36 |
| 4 | 112 338 | 0 | 0 | 13 865 | 0 | 29 663 | 6,29 | -0,02 | -0,02 | 0,38 | -0,02 | 1,33 |
| 5 | 159 139 | 1 848 | 0 | 23 704 | 6 686 | 47 232 | 9,10 | 0,08 | -0,02 | 0,97 | 0,33 | 2,38 |
| 6 | 263 027 | 10 289 | 1 387 | 38 149 | 17 293 | 97 868 | 15,35 | 0,16 | 0,06 | 1,84 | 0,58 | 5,42 |
| 7 | 408 616 | 19 502 | 2 382 | 50 110 | 36 126 | 157 622 | 24,09 | 0,72 | 0,11 | 2,56 | 1,72 | 9,01 |
| 8 | 564 952 | 35 365 | 4 370 | 61 602 | 70 638 | 216 368 | 33,48 | 1,67 | 0,21 | 3,25 | 3,79 | 12,54 |
| 10 | 973 821 | 150 915 | 12 678 | 83 252 | 191 689 | 329 469 | 58,04 | 8,61 | 0,31 | 4,55 | 11,06 | 19,34 |
| 15 | 1 696 218 | 515 313 | 92 487 | 144 375 | 781 230 | 595 810 | 101,44 | 30,50 | 5,10 | 8,22 | 46,47 | 35,34 |
| 20 | 2 205 898 | 1 022 555 | 414 710 | 270 831 | 1 398 815 | 891 499 | 132,06 | 60,97 | 24,46 | 15,81 | 83,57 | 53,10 |
| 26 | 2 815 515 | 1 700 130 | 1 146 994 | 623 021 | 1 898 269 | 1 398 189 | 168,68 | 101,67 | 68,45 | 36,97 | 113,58 | 83,54 |
| 30 | 3 308 877 | 2 094 940 | 1 731 581 | 922 372 | 2 221 910 | 1 782 311 | 198,31 | 125,39 | 103,56 | 54,95 | 133,02 | 106,61 |
| 33 | 3 295 779 | 2 282 390 | 1 964 860 | 1 090 331 | 2 374 079 | 2 010 160 | 197,53 | 136,65 | 117,58 | 65,04 | 142,16 | 120,30 |
| 36 | 3 286 437 | 2 441 800 | 2 150 329 | 1 267 425 | 2 507 100 | 2 222 708 | 196,96 | 146,23 | 128,72 | 75,68 | 150,15 | 133,07 |
| 40 | 3 272 661 | 2 619 295 | 2 358 835 | 1 563 083 | 2 664 834 | 2 470 407 | 196,14 | 156,89 | 141,24 | 93,44 | 159,62 | 147,94 |

Kalibrační řada I



Kalibrační řada II



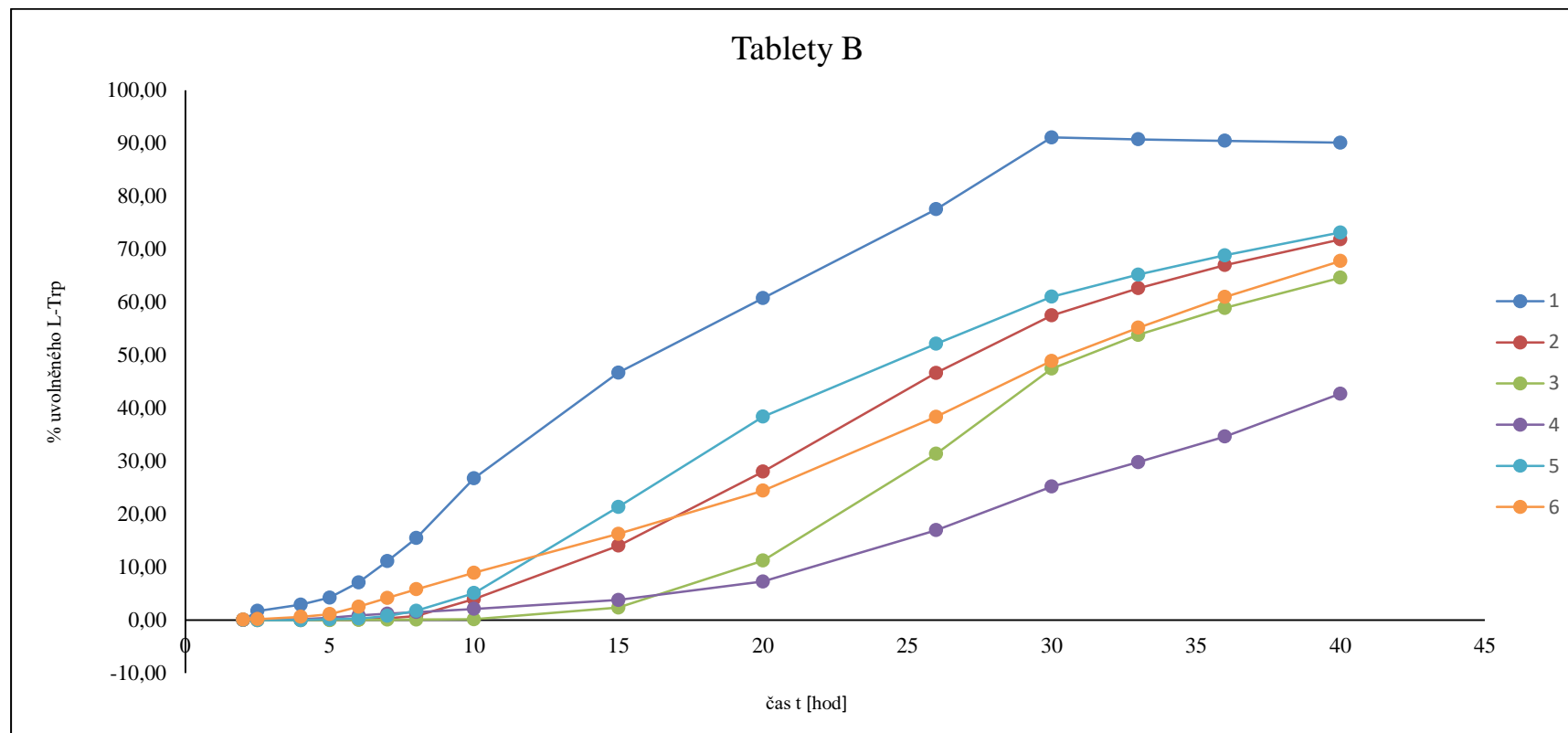
Koncentrace L-Trp

ve vzorcích

| Čas odběru vzorku od počátku | Koncentrace L-Trp ve vzorcích [mg/L] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|-------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------------|-------|---------------|
| | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | 4 ** | % | % korig. na změnu objemu | 5 ** | % | % korig. na změnu objemu | 6 ** | % | % korig. na změnu objemu | Průměr % | SD % | RSD % |
| 2 hod * | N.A. | N.A. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,11 | 0,05 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,24 | 0,11 | 0,06 | 0,01 | 0,03 | 203,61 |
| 2.5 hod | 3,85 | 1,79 | 1,71 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,23 | 0,11 | 0,11 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 2,98 | 1,39 | 0,17 | 0,33 | 0,62 | 189,95 |
| 4 hod | 6,31 | 2,94 | 2,92 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,38 | 0,18 | 0,18 | 0,10 | 0,05 | -0,01 | 1,33 | 0,62 | 0,62 | 0,62 | 1,05 | 171,46 |
| 5 hod | 9,15 | 4,26 | 4,22 | 0,08 | 0,04 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,97 | 0,45 | 0,45 | 0,33 | 0,15 | 0,15 | 2,39 | 1,11 | 1,10 | 0,99 | 1,49 | 150,25 |
| 6 hod | 15,44 | 7,18 | 7,11 | 0,16 | 0,08 | 0,08 | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 1,85 | 0,86 | 0,85 | 0,59 | 0,27 | 0,27 | 5,46 | 2,54 | 2,51 | 1,81 | 2,52 | 139,36 |
| 7 hod | 24,29 | 11,30 | 11,15 | 0,72 | 0,34 | 0,33 | 0,11 | 0,05 | 0,05 | 2,58 | 1,20 | 1,18 | 1,73 | 0,80 | 0,79 | 9,09 | 4,23 | 4,17 | 2,94 | 3,91 | 132,76 |
| 8 hod | 33,79 | 15,71 | 15,47 | 1,68 | 0,78 | 0,77 | 0,21 | 0,10 | 0,10 | 3,27 | 1,52 | 1,50 | 3,82 | 1,78 | 1,75 | 12,66 | 5,89 | 5,79 | 4,23 | 5,35 | 126,38 |
| 10 hod | 58,69 | 27,30 | 26,78 | 8,71 | 4,05 | 3,96 | 0,31 | 0,14 | 0,14 | 4,60 | 2,14 | 2,10 | 11,18 | 5,20 | 5,09 | 19,55 | 9,09 | 8,92 | 7,83 | 8,89 | 113,54 |
| 15 hod | 102,66 | 47,75 | 46,72 | 30,87 | 14,36 | 14,02 | 5,16 | 2,40 | 2,34 | 8,32 | 3,87 | 3,79 | 47,04 | 21,88 | 21,37 | 35,76 | 16,63 | 16,27 | 17,42 | 14,72 | 84,50 |
| 20 hod | 133,91 | 62,29 | 60,77 | 61,83 | 28,76 | 28,00 | 24,80 | 11,53 | 11,23 | 16,04 | 7,46 | 7,27 | 84,75 | 39,42 | 38,39 | 53,85 | 25,04 | 24,42 | 28,35 | 17,82 | 62,85 |
| 26 hod | 171,22 | 79,64 | 77,54 | 103,21 | 48,00 | 46,65 | 69,48 | 32,32 | 31,38 | 37,53 | 17,45 | 16,96 | 115,29 | 53,62 | 52,14 | 84,50 | 39,30 | 38,37 | 43,84 | 18,80 | 42,88 |
| 30 hod | 201,70 | 93,81 | 91,10 | 127,53 | 59,32 | 57,50 | 105,33 | 48,99 | 47,44 | 55,89 | 26,00 | 25,19 | 135,29 | 62,93 | 61,03 | 108,43 | 50,43 | 48,92 | 55,20 | 19,70 | 35,69 |
| 33 hod | 201,10 | 93,53 | 90,74 | 139,12 | 64,71 | 62,64 | 119,70 | 55,67 | 53,84 | 66,22 | 30,80 | 29,80 | 144,73 | 67,32 | 65,20 | 122,47 | 56,96 | 55,17 | 59,57 | 18,03 | 30,27 |
| 36 hod | 200,92 | 93,45 | 90,49 | 149,16 | 69,38 | 67,01 | 131,30 | 61,07 | 58,92 | 77,20 | 35,91 | 34,65 | 153,16 | 71,24 | 68,85 | 135,74 | 63,13 | 61,00 | 63,49 | 16,48 | 25,95 |
| 40 hod | 200,27 | 93,15 | 90,11 | 161,00 | 74,88 | 71,87 | 144,22 | 67,08 | 64,63 | 95,41 | 44,38 | 42,74 | 162,99 | 75,81 | 73,16 | 151,06 | 70,26 | 67,77 | 68,38 | 14,02 | 20,50 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

Disoluční profily

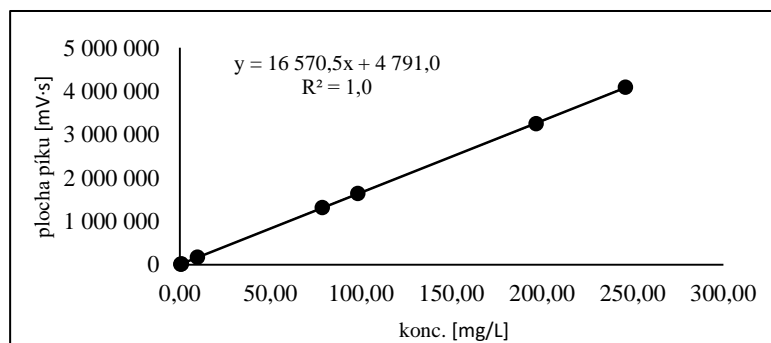


Příloha F - Disoluce tablet B – 100 rpm

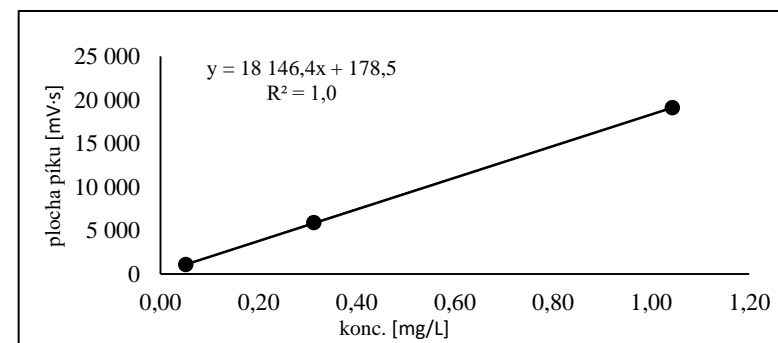
Plochy L-Trp

| hod | Plocha píků [mV·s] | | | | | | X | | | | | |
|-----|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | (A ₁ -q)/k | (A ₂ -q)/k | (A ₃ -q)/k | (A ₄ -q)/k | (A ₅ -q)/k | (A ₆ -q)/k |
| 2 | 17 133 | 30 347 | 17 618 | 0 | 7 234 | 61 773 | 0,00 | 1,66 | 0,96 | -0,01 | 0,39 | 3,39 |
| 2,5 | 16 501 | 29 127 | 17 552 | 0 | 6 237 | 63 302 | 0,90 | 1,60 | 0,96 | -0,01 | 0,33 | 3,48 |
| 4 | 28 003 | 45 816 | 38 762 | 0 | 29 849 | 152 565 | 1,40 | 2,51 | 2,13 | -0,29 | 1,64 | 8,92 |
| 5 | 37 997 | 68 527 | 63 124 | 1 419 | 66 816 | 252 142 | 2,00 | 3,77 | 3,47 | -0,20 | 3,67 | 14,93 |
| 6 | 57 142 | 143 012 | 96 279 | 6 812 | 101 287 | 373 661 | 3,16 | 8,34 | 5,30 | 0,12 | 5,82 | 22,26 |
| 7 | 124 120 | 274 156 | 145 939 | 26 324 | 146 921 | 508 718 | 7,20 | 16,26 | 8,03 | 1,30 | 8,58 | 30,41 |
| 8 | 212 880 | 458 881 | 232 510 | 75 156 | 209 048 | 647 505 | 12,56 | 27,40 | 12,80 | 4,25 | 12,33 | 38,79 |
| 10 | 475 720 | 935 259 | 510 062 | 204 392 | 425 320 | 971 448 | 28,42 | 56,15 | 30,49 | 12,05 | 25,38 | 58,33 |
| 15 | 1 304 120 | 1 815 600 | 1 287 779 | 790 866 | 1 003 496 | 1 690 878 | 78,41 | 109,28 | 77,42 | 47,44 | 60,27 | 101,75 |
| 20 | 1 869 796 | 2 287 921 | 1 810 326 | 1 441 673 | 1 549 520 | 2 148 308 | 112,55 | 137,78 | 108,96 | 86,71 | 93,22 | 129,35 |
| 26 | 2 495 387 | 2 676 493 | 2 248 377 | 2 020 284 | 2 012 978 | 2 482 414 | 150,30 | 161,23 | 135,39 | 121,63 | 121,19 | 149,52 |
| 30 | 2 853 372 | 2 951 772 | 2 588 339 | 2 386 462 | 2 320 954 | 2 737 586 | 171,90 | 177,84 | 155,91 | 143,73 | 139,77 | 164,91 |
| 33 | 2 981 184 | 3 149 265 | 2 746 499 | 2 558 803 | 2 480 727 | 2 833 725 | 179,61 | 189,76 | 165,45 | 154,13 | 149,41 | 170,72 |
| 36 | 3 078 765 | 3 156 970 | 2 884 633 | 2 694 960 | 2 603 083 | 2 914 665 | 185,50 | 190,22 | 173,79 | 162,34 | 156,80 | 175,60 |
| 40 | 3 157 419 | 3 142 975 | 3 020 564 | 2 841 982 | 2 776 436 | 3 002 683 | 190,25 | 189,38 | 181,99 | 171,21 | 167,26 | 180,91 |

Kalibrační řada I



Kalibrační řada II

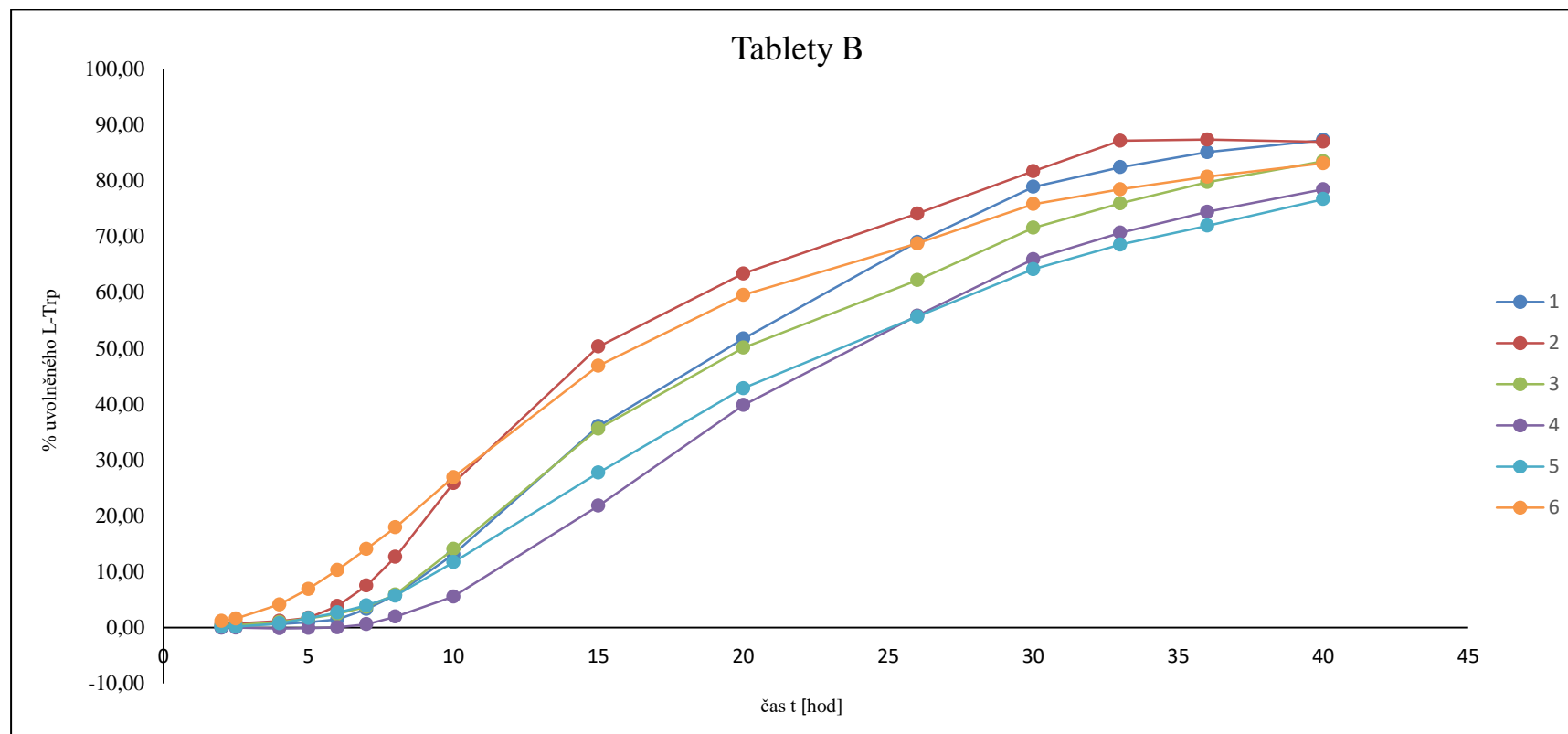


Koncentrace L-Trp ve vzorcích

| Čas odběru vzorku od počátku | Koncentrace L-Trp ve vzorcích [mg/L] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------------|------|---------------|
| | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | 4 ** | % | % korig. na změnu objemu | 5 ** | % | % korig. na změnu objemu | 6 ** | % | % korig. na změnu objemu | Průměr % | SD % | RSD % |
| 2 hod * | 0,93 | 0,43 | 0,00 | 2,06 | 0,96 | 0,58 | 1,28 | 0,60 | 0,34 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,52 | 0,24 | 0,14 | 4,58 | 2,13 | 1,18 | 0,37 | 0,42 | 111,91 |
| 2.5 hod | 0,90 | 0,42 | 0,42 | 1,47 | 0,68 | 0,74 | 0,96 | 0,45 | 0,45 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,34 | 0,16 | 0,16 | 3,54 | 1,65 | 1,62 | 0,56 | 0,53 | 93,78 |
| 4 hod | 1,41 | 0,65 | 0,65 | 2,48 | 1,15 | 1,17 | 2,06 | 0,96 | 0,99 | 0,00 | 0,00 | -0,13 | 1,52 | 0,71 | 0,76 | 8,95 | 4,16 | 4,14 | 1,26 | 1,35 | 107,04 |
| 5 hod | 2,01 | 0,94 | 0,93 | 3,87 | 1,80 | 1,75 | 3,54 | 1,65 | 1,61 | 0,07 | 0,03 | -0,09 | 3,76 | 1,75 | 1,70 | 15,00 | 6,98 | 6,92 | 2,14 | 2,23 | 104,61 |
| 6 hod | 3,18 | 1,48 | 1,46 | 8,39 | 3,90 | 3,86 | 5,55 | 2,58 | 2,45 | 0,37 | 0,17 | 0,06 | 5,86 | 2,72 | 2,70 | 22,39 | 10,42 | 10,31 | 3,47 | 3,27 | 94,22 |
| 7 hod | 7,26 | 3,38 | 3,33 | 16,39 | 7,62 | 7,52 | 8,59 | 3,99 | 3,72 | 1,31 | 0,61 | 0,60 | 8,65 | 4,02 | 3,97 | 30,65 | 14,26 | 14,08 | 5,53 | 4,32 | 78,01 |
| 8 hod | 12,67 | 5,89 | 5,80 | 27,65 | 12,86 | 12,65 | 13,87 | 6,45 | 5,92 | 4,29 | 1,99 | 1,96 | 12,44 | 5,79 | 5,70 | 39,14 | 18,20 | 17,94 | 8,33 | 5,33 | 64,07 |
| 10 hod | 28,73 | 13,36 | 13,10 | 56,77 | 26,40 | 25,89 | 30,83 | 14,34 | 14,06 | 12,18 | 5,66 | 5,55 | 25,66 | 11,93 | 11,70 | 58,98 | 27,43 | 26,93 | 16,20 | 7,71 | 47,60 |
| 15 hod | 79,35 | 36,91 | 36,07 | 110,59 | 51,44 | 50,30 | 78,36 | 36,44 | 35,62 | 48,01 | 22,33 | 21,81 | 60,99 | 28,37 | 27,74 | 102,97 | 47,89 | 46,88 | 36,40 | 9,93 | 27,28 |
| 20 hod | 114,13 | 53,08 | 51,73 | 139,71 | 64,98 | 63,38 | 110,49 | 51,39 | 50,09 | 87,93 | 40,90 | 39,83 | 94,53 | 43,97 | 42,85 | 131,17 | 61,01 | 59,55 | 51,24 | 8,35 | 16,30 |
| 26 hod | 152,56 | 70,96 | 69,03 | 163,65 | 76,12 | 74,12 | 137,43 | 63,92 | 62,20 | 123,46 | 57,42 | 55,83 | 123,01 | 57,21 | 55,67 | 151,76 | 70,59 | 68,79 | 64,27 | 6,95 | 10,81 |
| 30 hod | 174,83 | 81,32 | 78,91 | 180,87 | 84,13 | 81,72 | 158,56 | 73,75 | 71,59 | 146,17 | 67,99 | 65,94 | 142,15 | 66,12 | 64,17 | 167,72 | 78,01 | 75,83 | 73,03 | 6,44 | 8,82 |
| 33 hod | 182,85 | 85,05 | 82,43 | 193,18 | 89,85 | 87,16 | 168,44 | 78,34 | 75,95 | 156,91 | 72,98 | 70,69 | 152,11 | 70,75 | 68,57 | 173,79 | 80,83 | 78,48 | 77,21 | 6,41 | 8,30 |
| 36 hod | 189,22 | 88,01 | 85,12 | 194,03 | 90,25 | 87,37 | 177,27 | 82,45 | 79,75 | 165,59 | 77,02 | 74,43 | 159,94 | 74,39 | 71,94 | 179,12 | 83,31 | 80,71 | 79,89 | 5,43 | 6,80 |
| 40 hod | 194,25 | 90,35 | 87,28 | 193,36 | 89,94 | 86,99 | 185,82 | 86,43 | 83,48 | 174,82 | 81,31 | 78,47 | 170,78 | 79,43 | 76,70 | 184,72 | 85,91 | 83,13 | 82,68 | 3,96 | 4,79 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

Disoluční profily

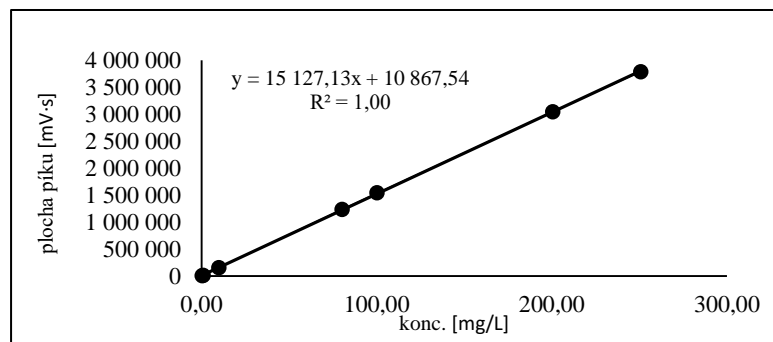


Příloha G - Disoluce tablet A – 100 rpm (košíčky)

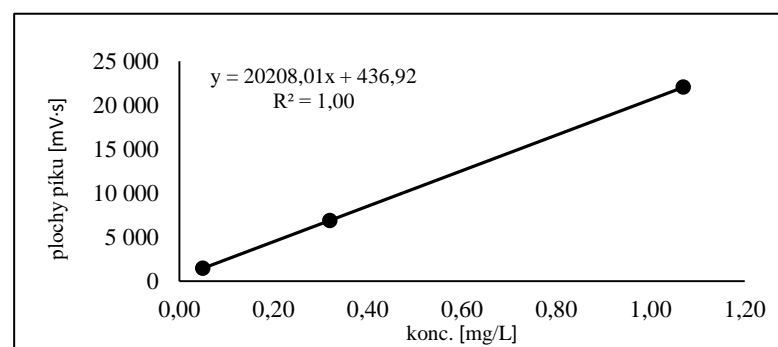
Plochy L - Trp

| hod | Plocha píkú [mV·s] | | | | | | X | | | | | |
|-----|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | (A ₁ -q)/k | (A ₂ -q)/k | (A ₃ -q)/k | (A ₄ -q)/k | (A ₅ -q)/k | (A ₆ -q)/k |
| 2 | 475 000 | 76 902 | 103 036 | 90 445 | 100 194 | 111 533 | 30,68 | 4,37 | 6,09 | 5,26 | 5,91 | 6,65 |
| 2,5 | 445 435 | 86 491 | 113 203 | 104 502 | 137 837 | 127 344 | 28,73 | 5,00 | 6,77 | 6,19 | 8,39 | 7,70 |
| 4 | 633 467 | 151 247 | 183 502 | 159 547 | 244 406 | 206 325 | 41,16 | 9,28 | 11,41 | 9,83 | 15,44 | 12,92 |
| 5 | 719 130 | 194 890 | 227 879 | 193 155 | 306 651 | 258 505 | 46,82 | 12,17 | 14,35 | 12,05 | 19,55 | 16,37 |
| 6 | 804 738 | 239 180 | 271 594 | 227 997 | 367 278 | 319 718 | 52,48 | 15,09 | 17,24 | 14,35 | 23,56 | 20,42 |
| 7 | 904 073 | 285 633 | 319 594 | 265 821 | 422 782 | 390 218 | 59,05 | 18,16 | 20,41 | 16,85 | 27,23 | 25,08 |
| 8 | 1 014 279 | 332 619 | 370 559 | 307 871 | 476 931 | 473 426 | 66,33 | 21,27 | 23,78 | 19,63 | 30,81 | 30,58 |
| 10 | 1 251 893 | 445 647 | 471 194 | 412 810 | 587 491 | 672 795 | 82,04 | 28,74 | 30,43 | 26,57 | 38,12 | 43,76 |
| 15 | 1 702 758 | 784 094 | 713 174 | 805 950 | 900 927 | 1 158 455 | 111,85 | 51,12 | 46,43 | 52,56 | 58,84 | 75,86 |
| 20 | 2 095 425 | 1 316 378 | 979 777 | 1 364 668 | 1 362 551 | 1 657 453 | 137,80 | 86,30 | 64,05 | 89,50 | 89,36 | 108,85 |
| 26 | 2 472 656 | 1 812 427 | 1 379 665 | 1 751 290 | 2 015 913 | 2 124 825 | 162,74 | 119,10 | 90,49 | 115,05 | 132,55 | 139,75 |

Kalibrační řada I



Kalibrační řada II

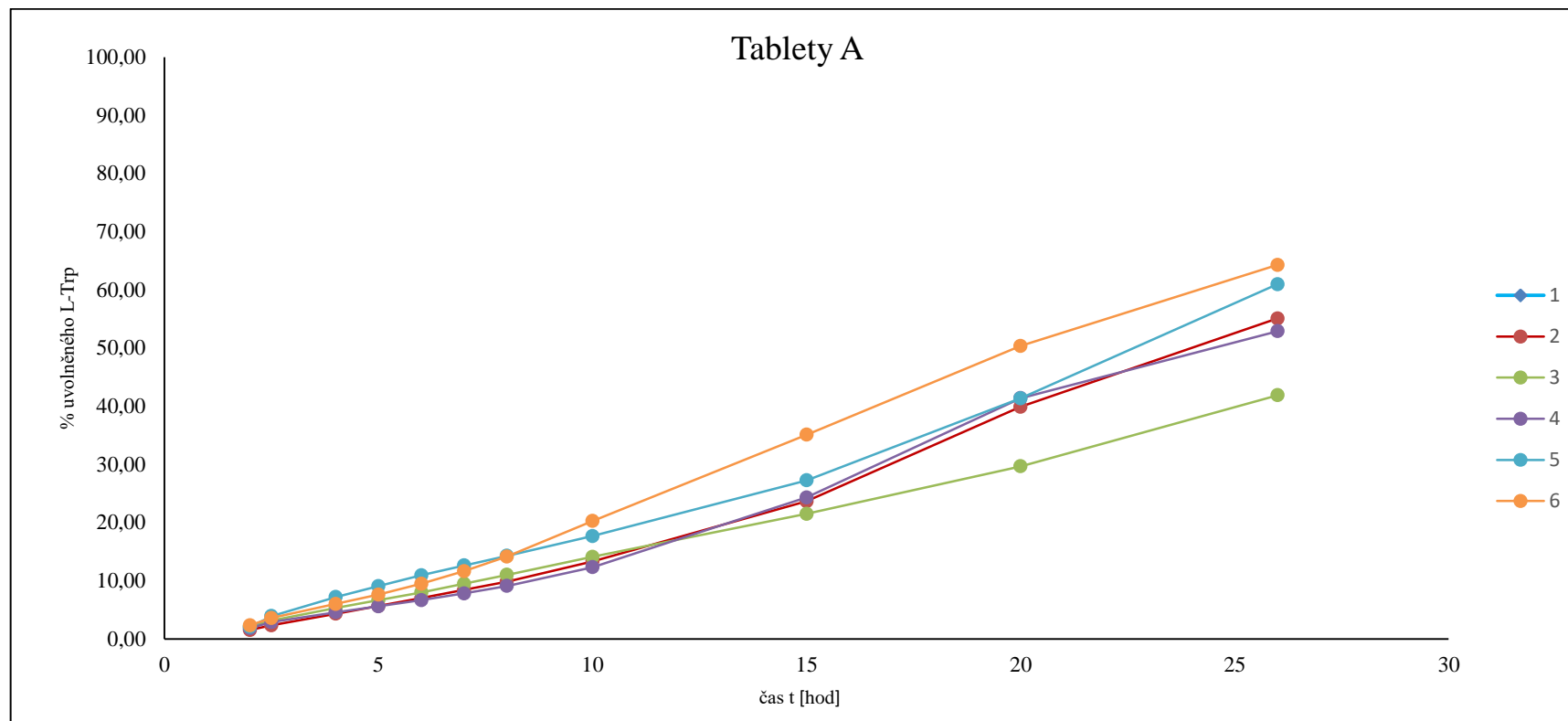


Koncentrace L – Trp ve vzorcích

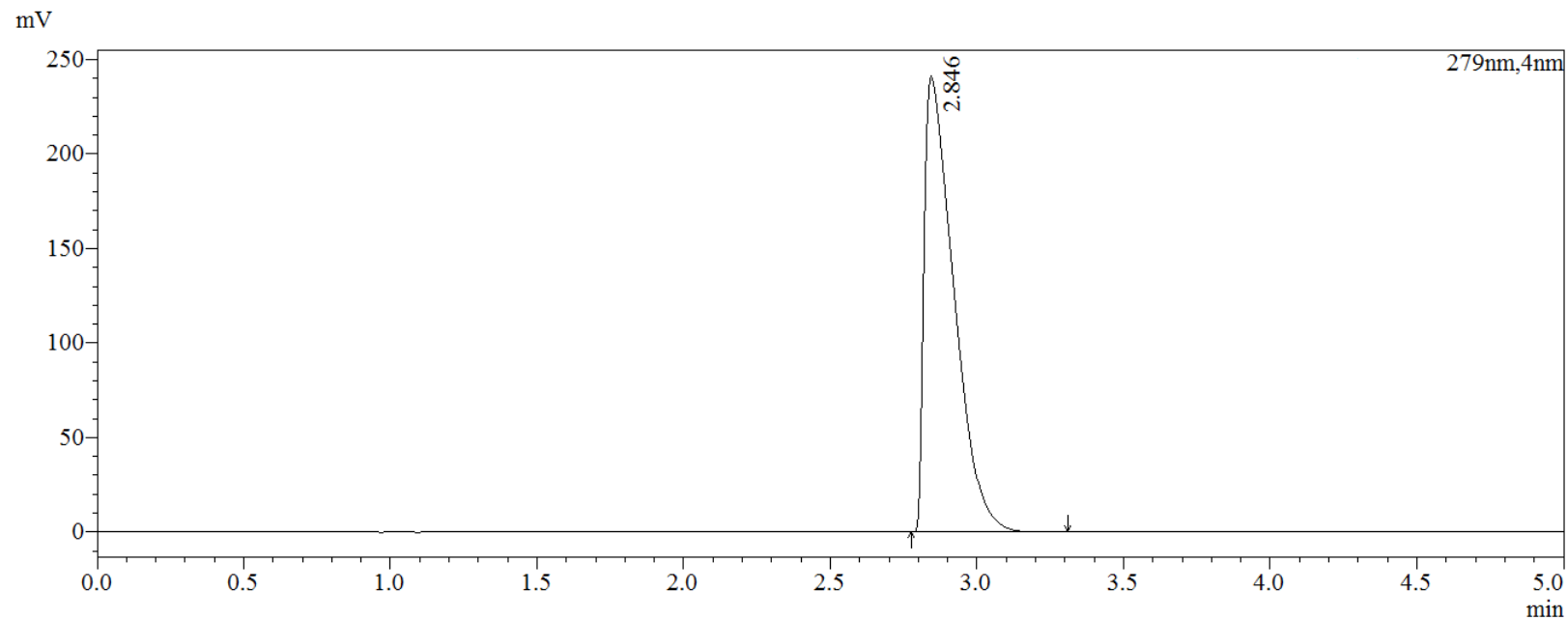
| Čas odběru vzorku od počátku | Koncentrace L-Trp ve vzorcích [mg/L] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|-------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------------|-------|--------------|
| | 1 ** | % | % korig. na změnu objemu | 2 ** | % | % korig. na změnu objemu | 3 ** | % | % korig. na změnu objemu | 4 ** | % | % korig. na změnu objemu | 5 ** | % | % korig. na změnu objemu | 6 ** | % | % korig. na změnu objemu | Průměr % | SD % | RSD % |
| 2 hod * | 40,91 | 19,03 | 10,70 | 5,83 | 2,71 | 1,52 | 8,13 | 3,78 | 2,13 | 7,02 | 3,27 | 1,84 | 7,88 | 3,67 | 2,06 | 8,88 | 4,13 | 2,32 | 3,43 | 3,26 | 95,19 |
| 2.5 hod | 28,79 | 13,39 | 13,36 | 5,02 | 2,33 | 2,32 | 6,79 | 3,16 | 3,15 | 6,21 | 2,89 | 2,88 | 8,42 | 3,92 | 3,90 | 7,72 | 3,59 | 3,58 | 4,87 | 3,83 | 78,77 |
| 4 hod | 41,29 | 19,20 | 19,13 | 9,32 | 4,33 | 4,31 | 11,45 | 5,33 | 5,30 | 9,87 | 4,59 | 4,57 | 15,49 | 7,21 | 7,17 | 12,97 | 6,03 | 6,00 | 7,75 | 5,18 | 66,84 |
| 5 hod | 47,06 | 21,89 | 21,75 | 12,23 | 5,69 | 5,65 | 14,43 | 6,71 | 6,66 | 12,12 | 5,64 | 5,59 | 19,66 | 9,14 | 9,07 | 16,46 | 7,66 | 7,60 | 9,39 | 5,66 | 60,25 |
| 6 hod | 52,80 | 24,56 | 24,37 | 15,19 | 7,07 | 7,00 | 17,35 | 8,07 | 8,00 | 14,45 | 6,72 | 6,66 | 23,71 | 11,03 | 10,93 | 20,55 | 9,56 | 9,47 | 11,07 | 6,12 | 55,30 |
| 7 hod | 59,52 | 27,68 | 27,40 | 18,32 | 8,52 | 8,42 | 20,58 | 9,57 | 9,46 | 17,00 | 7,91 | 7,81 | 27,45 | 12,77 | 12,62 | 25,28 | 11,76 | 11,62 | 12,89 | 6,70 | 52,02 |
| 8 hod | 66,93 | 31,13 | 30,76 | 21,47 | 9,99 | 9,85 | 24,00 | 11,16 | 11,01 | 19,82 | 9,22 | 9,09 | 31,09 | 14,46 | 14,27 | 30,86 | 14,35 | 14,16 | 14,86 | 7,38 | 49,66 |
| 10 hod | 82,94 | 38,58 | 38,04 | 29,06 | 13,52 | 13,31 | 30,77 | 14,31 | 14,10 | 26,87 | 12,50 | 12,31 | 38,54 | 17,93 | 17,66 | 44,24 | 20,58 | 20,25 | 19,28 | 8,82 | 45,75 |
| 15 hod | 113,19 | 52,64 | 51,84 | 51,73 | 24,06 | 23,64 | 46,99 | 21,85 | 21,49 | 53,19 | 24,74 | 24,30 | 59,55 | 27,70 | 27,24 | 76,78 | 35,71 | 35,08 | 30,60 | 10,44 | 34,11 |
| 20 hod | 139,73 | 64,99 | 63,88 | 87,51 | 40,70 | 39,90 | 64,95 | 30,21 | 29,65 | 90,75 | 42,21 | 41,37 | 90,61 | 42,14 | 41,35 | 110,37 | 51,34 | 50,34 | 44,41 | 10,58 | 23,82 |
| 26 hod | 165,18 | 76,83 | 75,02 | 120,88 | 56,22 | 55,07 | 91,84 | 42,72 | 41,88 | 116,78 | 54,31 | 52,89 | 134,53 | 62,57 | 60,95 | 141,84 | 65,97 | 64,27 | 58,34 | 10,26 | 17,58 |

* Odběr po 2 hodinách - v 0.1N HCl - bezprostředně před úpravou pH; další odběry v pufru pH 6.8

Disoluční profily



Příloha H - Ukázka chromatogramu



Ukázka chromatogramu z kapalinové chromatografie vyhodnocené programem LCSolution Version 1.22. SP1, pro roztok odpovídající koncentraci 100 mg/L s retenčním časem 2,846 min.

Údaje pro univerzitní knihovnu

| | |
|---------------|---|
| Název práce | Disoluční testy suplementu pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu |
| Autor práce | Bc. Aneta Šnajdrová |
| Obor | Ochrana životního prostředí |
| Rok obhajoby | 2018 |
| Vedoucí práce | Ing. Jaroslava Kořínková, Dr. |
| Anotace | Diplomová práce se zabývá popisem disolučních testů suplementu s obsahem účinné látky L – tryptofan pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu. V teoretické části je popsán disoluční přístroj a metoda, parametry ovlivňující rozpustnost aktivních látek, analytická metoda HPLC a parametry validace. Experimentální část se zabývá validací HPLC metody a zkouškou disoluce tablet s obsahem L – tryptofanu. Kapitola výsledky a diskuze obsahuje vyhodnocená data, popis jednotlivých disolučních zkoušek tablet a jejich porovnání. |
| Klíčová slova | Disoluce, disoluční zkouška, rozpustnost, L – tryptofan, HPLC, validace |