

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Monika Zouzalová

Hromadně vyráběné léčivé přípravky jako alternativní zdroj
referenčních materiálů pro kalibraci

Mass Produced Medical Products as an Alternative Source
of Reference Materials for Calibration

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11. května 2024.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce je statistické prokázání, zdali lze využít hromadně vyráběné léčivé přípravky jako alternativní zdroj referenčních materiálů pro kalibraci v analytické chemii. Tyto přípravky by mohly být potenciální alternativou v případech, kdy hraje zásadní roli čas, například při klinickém vyšetření intoxikace, není-li po ruce analytický certifikovaný referenční materiál. Jako analytická metoda byla vybrána jedna v praxi z nejpoužívanějších metod, vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Jako hromadně vyráběné léčivé přípravky byly využity léčivé přípravky s obsahem účinné látky paracetamol a kodein, a to konkrétně Panadol Novum 500 mg, Paramax RAPID 500 mg, Paramax RAPID 1 g, Paralen 500 mg, Codein Slovakofarma 28,72 mg a Talvosilen, který obsahuje obě zmíněné účinné látky, a to 500 mg paracetamolu a 30 mg kodeinu na jednu tabletu. U přípravku Paramax RAPID 500 mg byly testovány dvě rozdílné šarže. V průběhu celého analytického procesu byly testovány potenciální zdroje chyb, konkrétně vážení, příprava roztoků a měřicí přístroj. Každý jednotlivý potenciální zdroj chyb byl staticky testován na dvou typech zásobních roztoků za pomoci analýzy rozptylu a Studentova jednovýběrového *t*-testu. Bylo statisticky potvrzeno, že jednotlivé vybrané procesy nevnášejí do analytického postupu chyby. Za pomoci získaných směrnic kalibračních závislostí bylo dále statisticky prokázáno, že vybrané hromadně vyráběné léčivé přípravky mohou být alternativním zdrojem referenčních materiálů v analytické kalibraci.

Klíčová slova: hromadně vyráběné léčivé přípravky, kalibrace, referenční materiál, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí

Abstract

This thesis aims to statistically demonstrate whether mass-produced medicinal products can be used as an alternative source of reference materials for calibration in analytical chemistry. These preparations could be a potential alternative in cases where time is of the essence, for example in the clinical investigation of intoxication, if analytically certified reference material is not at hand. One of the most used methods in practice, high-performance liquid chromatography, was chosen as the analytical method. Like mass-produced medicinal products containing the active substances paracetamol and codeine were used, namely Panadol Novum 500 mg, Paramax RAPID 500 mg, Paramax RAPID 1 g, Paralen 500 mg, Codein Slovakofarma 28.72 mg and Talvosilen, which contains both mentioned active substances, namely 500 mg of paracetamol and 30 mg of codeine per tablet. Two different lots were tested for Paramax RAPID 500 mg. Potential sources of error were tested throughout the analytical process, namely weighing, solution preparation, and the measuring device. Each potential source of error was statically tested on two types of stock solutions using analysis of variance and Student's one-sample *t*-test. It was statistically confirmed that the individually selected processes do not introduce errors in the analytical procedure. With the help of the obtained calibration dependence guidelines, it was further statistically proven that selected mass-produced medicinal products can be an alternative source of reference materials in analytical calibration.

Key words: calibration, high performance liquid chromatography with UV detection, mass-produced medicinal products, reference materials

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc a připomínky, které mi velice pomohly při vypracování této diplomové práce.

Obsah

1	Cíl diplomové práce	10
2	Teoretická část	11
2.1	Kalibrace v analytické chemii	11
2.2	Kalibrace v kvalitativní a kvantitativní analýze	12
2.3	Analytické metody měření	12
2.4	Kalibrace vnějšími standardy	13
2.5	Metoda nejmenších čtverců.....	14
2.6	Referenční materiály v kalibraci	16
2.6.1	Klasifikace a návaznost referenčních materiálů	17
2.6.2	Popis a nabídka referenčních materiálů.....	17
2.6.3	Vhodnost referenčních materiálů	18
2.7	Hromadně vyráběné léčivé přípravky	19
2.8	Paracetamol.....	20
2.8.1	Stanovení substance paracetamolu dle lékopisů.....	21
2.8.2	Stanovení paracetamolu v tabletách dle Amerického a Britského lékopisu	22
2.9	Kodein	23
2.9.1	Stanovení substance kodein-fosfát hemihydrátu dle lékopisů.....	24
2.9.2	Stanovení kodein-fosfát hemihydrátu v tabletách dle Amerického lékopisu	25
2.10	Jednotnost obsahu léčivých přípravků	26
2.10.1	Zkouška na obsahovou stejnoměrnost tablet dle lékopisů.....	26
2.10.2	Zkouška na hmotnostní proměnlivost tablet dle lékopisů	28
2.10.3	Obsah účinné látky v tabletách dle lékopisů	29
2.11	Východiska řešení diplomové práce.....	30
2.12	Schéma přípravy a měření kalibračních roztoků	30
3	Experimentální část	31
3.1	Referenční materiály studovaných léčivých látek.....	31
3.2	Analyzované hromadně vyráběné léčivé přípravky	31
3.3	Použité chemikálie	32
3.4	Použité přístroje	32
3.5	Pracovní postupy	33
3.5.1	Stanovení paracetamolu	33
3.5.1.1	Příprava roztoků	33
3.5.1.2	Spektrometrické testování stability u RMP	33
3.5.1.3	Měření HPLC-UV kalibračních závislostí pro CRMP a RMP	34
3.5.1.4	Měření HPLC-UV kalibračních závislostí pro ARMP.....	34
3.5.2	Stanovení kodeinu.....	37
3.5.2.1	Příprava roztoku.....	37
3.5.2.2	Měření kalibračních závislostí pro RMK	37

3.5.2.3	Měření kalibračních závislostí pro ARMK	37
3.5.3	Simultánní stanovení paracetamolu a kodeinu	38
3.5.3.1	Příprava roztoků	38
3.5.3.2	Měření kalibračních závislostí pro CRMP a RMK	38
3.5.3.3	Měření kalibračních závislostí u ARMPK	39
3.6	Statistické zhodnocení dat	40
4	Výsledky a diskuze	43
4.1	Stanovení paracetamolu	43
4.1.1	Kalibrační závislost založená na CRMP	43
4.1.2	Kalibrační závislost založená na RMP	46
4.1.2.1	Spektrometrická stabilita roztoku RMP	46
4.1.2.2	Naměřená data pro sestavení kalibračních závislostí RMP	47
4.1.2.3	Testování shodnosti RM s CRM	52
4.1.2.4	Vytyčení mezí pro použitelnost ARM na základě RM	54
4.1.2.5	Testování vlivu měřicího přístroje na parametry kalibračních závislostí pro RMP	56
4.1.2.6	Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro RM	58
4.1.2.7	Testování vlivu vážení na parametry kalibrační závislosti pro RMP	63
4.1.3	Kalibrační závislost založená na ARMP	64
4.1.3.1	Naměřená data pro sestavení kalibračních závislostí ARMP2	64
4.1.3.2	Testování vlivu měřicího přístroje na parametry kalibračních závislostí pro ARMP2	68
4.1.3.3	Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro ARMP2	70
4.1.3.4	Testování vlivu vážení na parametry kalibračních závislostí pro ARMP2	74
4.1.3.5	Nahrazení ARMP za RMP	76
4.2	Stanovení kodeinu	79
4.2.1	Kalibrační závislost založená na RMK	79
4.2.1.1	Nahrazení ARMK za RMK	81
4.3	Simultánní stanovení paracetamolu a kodeinu	82
4.3.1	Kalibrační závislost založená na CRMP	82
4.3.2	Kalibrační závislost založená na ARMPK	84
5	Závěr	86

Seznam použitých zkratek a symbolů

a	směrnice lineární regrese kalibrační závislosti
A	absorbance
A	plocha chromatografického píku [mAU min ⁻¹]
A	obsah léčivé látky [%]
AV	hodnota přijatelnosti
$ARMK$	alternativní referenční materiál kodeinu
$ARMP$	alternativní referenční materiál paracetamolu
$ARMPK$	alternativní referenční materiál paracetamolu a kodeinu
b	úsek lineární regrese kalibrační závislosti
c	molární koncentrace [mol dm ⁻³]
$CRMP$	certifikovaný referenční materiál paracetamolu
F	testovací kritérium při analýze rozptylu
F_{krit}	kritická hodnota testovacího kritéria při analýze rozptylu
H_0	nulová hypotéza
k	počet populací (skupin)
k	konstanta přijatelnosti
m	hmotnost [g]
M	referenční hodnota
MS	hodnota pro průměrný čtverec
n	počet pozorování
N	počet prokládaných bodů závislosti
R^2	koeficient determinace
RMK	referenční materiál kodeinu
RMP	referenční materiál paracetamolu
s	výběrová směrodatná odchylka
s_a	směrodatná odchylka směrnice
s_a	nejistota směrnice
S_A	variabilita mezi skupinami
S_E	variabilita v rámci skupin
s_b	směrodatná odchylka úseku
s_b	nejistota úseku

s_{regr}	směrodatná odchylka od regrese
SS	hodnota pro součet čtverců
$s_{\text{výsl}}$	směrodatná odchylka výsledku získaného z kalibrační křivky
T	testovací kritérium pro Studentův t -test
T_{krit}	kritická hodnota testovacího kritéria pro Studentův t -test
U	rozšířená nejistota
w_i	hmotnost jedné tablety [g]
\bar{W}	průměr jednotlivých hmotností [g]
x	nezávisle proměnná veličina
\bar{X}	průměr jednotlivých obsahů [%]
y	závisle proměnná veličina
\bar{y}	průměr všech pozorování
\bar{y}_i	průměr i -té skupiny
Y_{ij}	pozorování z i -té skupiny
α	počet stupňů volnosti
μ	střední hodnota
ν	počet stupňů volnosti

1 Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo statické dokázání, zdali lze využít hromadně vyráběné léčivé přípravky jako alternativní zdroj standardů ke kalibraci v analytické chemii. Byla zvolena v praxi nejběžněji používaná vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí. Jako testované přípravky byly zvoleny Panadol Novum 500 mg, Paramax RAPID 500 mg, Paramax RAPID 1 g, Paralen 500 mg, Codein Slovakofarma 28,72 mg a Talvosilen (paracetamol 500 mg, kodein 30 mg). Byly proměřeny kalibrační závislosti pro referenční materiály a tyto vybrané léčivé přípravky s obsahem paracetamolu a kodeinu. Získané kalibrační závislosti byly testovány na potenciální příčiny vzniku analytické chyby, za využití dvou druhů statického testování hypotéz, a to analýzy rozptylu a Studentova jednovýběrového *t*-testu.

2 Teoretická část

2.1 Kalibrace v analytické chemii

Termín „kalibrace“ je všeobecně chápán jako proces instrumentální standardizace či úpravy. Je obecně spojován s nastavením konkrétních parametrů předmětu na vyžadované veličiny a s nastavením požadovaného nástroje tak, aby správně vykonával svoji funkci [1]. Ovšem v analytické chemii je pojem „kalibrace“ chápán odlišně. Kalibrace se řadí mezi nejdůležitější aspekty v každém chemickém postupu, který vede ke stanovení typu a koncentrace (množství) analytu ve vzorku. I přes velký rozvoj analytických metod a přístrojového vybavení zůstává analytická kalibrace klíčovým prvkem v chemické praxi. Zejména přístroje používané pro instrumentální analýzu nám neposkytují konkrétní koncentraci analytu, ale pouze odezvu odpovídající přítomnosti analytu ve vzorku. Pomocí kalibrace transformujeme odezvu signálu na koncentraci (množství) analytu ve vzorku. Bez jednorozměrové kalibrace, která je součástí většiny analýz, by nebylo možné získat správné informace o množství a typu analytu přítomného ve vzorku [2, 3].

Proces analytické kalibrace zahrnuje převážně vykonávání měření a interpretaci naměřených dat, a proto se řadí do oblasti metrologie [1]. Český metrologický ústav definuje kalibraci jako „činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu pro získání výsledku měření z indikace“ [4]. Dle této definice kalibrace stanovuje metrologické charakteristiky přístroje, systému nebo referenčního materiálu.

Pojem kalibrace v analytickém kontextu spíše přibližuje IUPAC, která definuje analytickou kalibraci jako „proces určující funkční vztah mezi naměřenými hodnotami (intenzitou signálu) a analytickými veličinami charakterizující typy analytů a jejich množství“ [5].

2.2 Kalibrace v kvalitativní a kvantitativní analýze

V oblasti analytické chemie můžeme rozlišit dva přístupy ke kalibraci, a to kvalitativní a kvantitativní [6]. Proces kalibrace je obvykle spojován s kvantitativní analýzou, nicméně i v kvalitativní analýze je kalibrace důležitou součástí každého analytického postupu. Kvalitativní pojetí této problematiky zahrnuje kalibraci analytických parametrů, které vystihují typy chemických látek a vytvoření modelu sloužící pro účely identifikace. Jako příklad lze uvést potvrzení analytů v chromatografii na základě jejich retenčních časů [7]. V kvalitativní analýze je tedy identifikace analytu založena na hodnotě veličiny, která je charakteristická pro použitou metodu měření, jako například doba migrace, proudové napětí či vlnová délka. Analytická funkce zde popisuje vzájemný vztah mezi polohou signálu a typem analytu [8–9]. V kvantitativní analýze je mírou kvantity analytu nejvyšší intenzita měřeného signálu. Analytická funkce zde vyjadřuje vztah mezi intenzitou signálu a množstvím analytu ve vzorku [10].

2.3 Analytické metody měření

Hlavním cílem kvantitativní analytické chemie je stanovení obsahu či koncentrace vybraných analytů ve vzorcích, respektive stanovení určité kvantitativní veličiny. Abychom získali požadovanou kvantitativní veličinu je nutné vyjádřit matematický vztah mezi měřenými veličinami a stanovovanou kvantitativní veličinou. Podle povahy zmíněného matematického vztahu lze měření neznámých vzorků rozdělit na dva různé způsoby, a to absolutní (primární) a relativní (srovnávací) [11, 12].

Mezi absolutní metody řadíme takové metody, které k vyjádření vztahu mezi měřenými veličinami a hledanou kvantitativní veličinou vyžadují pouze veličiny, které lze dohledat v tabulkách či jsou zřejmé z teorie. Neboli jsou to metody, které jsou zcela popsány a pochopeny a jejich kompletní výčet nejistot je znám. Tyto vlastnosti jsou důvodem přijímání výsledků absolutních metod bez vztahu k referenčním materiálům měřené veličiny. Mezi primární metody patří gravimetrie, coulometrie, izotopové zředování s hmotnostní spektrometrií či neutronová aktivační analýza [13].

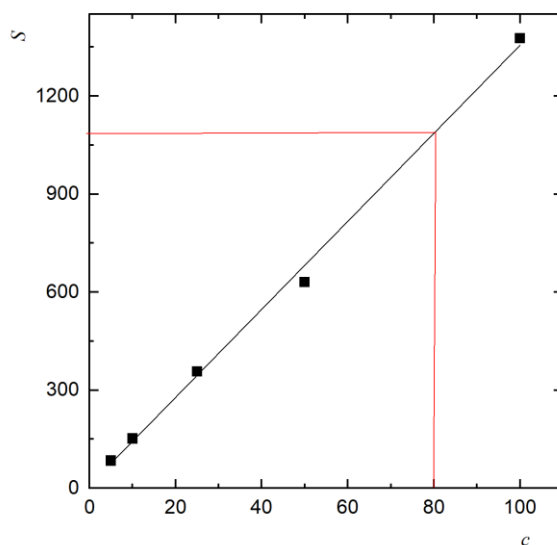
U relativních metod hraje zásadní roli analytická funkce, která vyjadřuje vztah mezi sledovanou kvantitativní veličinou a veličinou měřenou (2.1), zde mezi koncentrací analytu a přístrojového signálu

$$S = f(c) \quad (2.1)$$

Hledaný vztah je vyjádřen pomocí chemických standardů. Využití chemických standardů patří mezi nepostradatelnou část kalibrace a jsou používány v každé analytické metodě vyjímaje absolutní metody. V analytické praxi existuje několik kalibračních postupů, nejčastěji to jsou kalibrace vnějšími standardy, přímé porovnání či titrace [1].

2.4 Kalibrace vnějšími standardy

Kalibrace vnějšími standardy patří mezi nejčastěji využívané kalibrační postupy v analytické praxi a též je použita v této diplomové práci. Tento kalibrační postup je založen na přípravě sady roztoků standardů odděleně od analyzovaného vzorku. Sada kalibračních roztoků slouží k vytvoření kalibrační funkce, která je zhotovena na základě hodnot odezvy přístroje závislých na známém množství hledané látky. Kalibrační funkci lze získat dvěma způsoby, a to graficky nebo pomocí matematického vztahu. Nejběžněji používaným postupem k získání kalibrační křivky je použití grafu závislosti odezvy přístroje na známém množství analytu. Na obr. 2.1 je znázorněna ukázka lineární kalibrační funkce závislosti odezvy přístroje na koncentraci analytu. Při využití grafické kalibrační funkce je nejprve nutné proložit datové body přímkou. Tato přímka je dále využita k predikci neznámé koncentrace analytu ve vzorku, jak je na obr. 2.1 znázorněné červenou čarou [11].



Obr. 2.1 Lineární kalibrační funkce závislosti odezvy přístroje na množství analytu a ukázka odečtu koncentrace na základě změřeného signálu vzorku.

V dnešní době jsou grafické kalibrační metody nahrazeny počítačovými analýzami číselných dat. Mezi nejběžnější statistické metody patří metoda nejmenších čtverců, která nám umožňuje získání matematické rovnice popisující kalibrační funkci [11].

2.5 Metoda nejmenších čtverců

Metoda nejmenších čtverců se řadí mezi základní nástroje lineární regresní analýzy, která nám poskytuje informace ohledně datových bodů reprezentujících naměřená data. Informace jsou získány pomocí proložení souboru bodů v grafu přímkou, jak je znázorněno na obr. 2.1, kde svislá osa y popisuje závisle proměnnou, a naopak vodorovná osa x nezávisle proměnnou. Metodu nejmenších čtverců lze použít v situacích, kdy jsou splněny dva předpoklady [11]. První podmínkou je existující lineární vztah mezi závisle a nezávisle proměnnou veličinou, který nám matematicky popisuje rovnice

$$y = ax + b \quad (2.2)$$

kde y je závisle proměnná veličina, a je směrnice přímky, x je nezávisle proměnná veličina a b je úsek závisle proměnné veličiny. Druhým předpokladem jsou zanedbatelné nejistoty u nezávisle proměnných hodnot. Podmínky aplikace metody nejmenších čtverců jsou splněny u mnoha analytických metod, a proto jsou jedním z hlavních nástrojů využívajících v analytické chemii ke stanovení hledané koncentrace pomocí lineárně kalibrační závislosti [11].

Postup nalezení přímky metodou nejmenších čtverců je založen na minimalizaci součtu druhých mocnin reziduí pro všechny datové body. Reziduum je rozdíl mezi funkční a naměřenou hodnotou, respektive udává chybu, kterou se při proložení přímkou v příslušném bodě dopouštíme. Pomocí metody nejmenších čtverců taktéž získáme směrodatnou odchylku pro směrnici a úsek. Postup je proveden pomocí dvojité derivace, a to nejprve podle a a dále podle b , které se následně proloží do rovnosti nule. Vyřešením získané rovnice o dvou neznámých a a b získáme nejvhodnější odhady dvou neznámých, a to směrnice a úseku [11]. Výsledek součtu druhých mocnin reziduí získáme ze vztahu

$$S_{\text{rezid}} = \sum_{i=1}^N [y_i - (ax_i + b)]^2 \quad (2.3)$$

kde S_{rezid} je součet druhých mocnin reziduí, N je počet prokládaných bodů závislostí, y jsou závisle proměnné veličiny, x jsou nezávisle proměnné veličiny, a je směrnice přímky a b je úsek přímky.

Při nalezení přímky je velmi důležité definovat následující veličiny S_{xx} , S_{yy} a S_{xy} (2.4–2.6). Pomocí těchto definovaných matematických vztahů mohou být odvozeny potřebné veličiny, jako jsou směrnice (2.7), úsek (2.8), směrodatná odchylka od regrese (2.9), směrodatná odchylka směrnice (2.10), směrodatná odchylka úseku (2.11) a směrodatná odchylka výsledku získaného z kalibrační závislosti (2.12) [11].

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (2.4)$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 \cong \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (2.5)$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) \cong \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (2.6)$$

$$a = S_{xy}/S_{xx} \quad (2.7)$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (2.8)$$

$$s_{\text{regr}} = \sqrt{\frac{S_{yy} - a^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (2.9)$$

$$s_a = \sqrt{\frac{s_{\text{regr}}^2}{S_{xx}}} \quad (2.10)$$

$$s_b = s_{\text{regr}} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} = s_{\text{regr}} \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (2.11)$$

$$s_{\text{výsl}} = \frac{s_{\text{regr}}}{a} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_M - \bar{y})^2}{m^2 S_{xx}}} \quad (2.12)$$

kde x_i a y_i jsou dvojice dat veličin x a y , N je počet párů, \bar{x} a \bar{y} jsou průměrné hodnoty pro x a y , a je směrnice přímky, b je úsek přímky, s_{regr} je směrodatná odchylka od regrese, s_a je směrodatná odchylka směrnice, s_b je směrodatná odchylka úseku a $s_{\text{výsl}}$ je směrodatná odchylka výsledku získaného z kalibrační křivky [11, 14].

Dnes se tyto výpočty snadno realizují za pomoci počítačových programů.

2.6 Referenční materiály v kalibraci

Referenční materiály patří mezi hlavní nástroje využívané k realizaci řady aspektů jakosti měření a jsou používány napříč mnoha obory ke stanovení chemického složení, klinických, biologických, fyzikálních a inženýrských vlastností [15, 16]. Referenční materiály jsou užívány pro různé způsoby, a to pro kalibraci, validaci metod, odhad nejistoty měření a pro záměry vnějšího hodnocení jakosti a vnitřního řízení jakosti [17, 18]. Existuje několik typů referenčních materiálů, které jsou charakterizovány svou „identitou“ (například mikrobiologický druh a chemická struktura) nebo „hodnotou vlastnosti“ (například množství chemické složky). Nejčastěji využívanými typy referenčních materiálů jsou:

- *Čisté látky*, které jsou charakteristické pro obsah stopových nečistot a/nebo svoji chemickou čistotou.
- *Standardní roztoky a směsi plynů* vyráběné obvykle z čistých látek.
- *Matriční referenční materiály* obsahující určité hlavní, vedlejší nebo stopové chemické složky, které mohou být připraveny jako syntetické směsi nebo z matic obsahujících zájmové složky.

Čisté látky jsou důležitou součástí analytických postupů, jelikož jsou využívány při kalibraci postupu měření. Pracovní kalibrační roztoky jsou v procesu měření klíčové a k jejich přípravě je často využit čistý referenční materiál či certifikovaný roztok čistého materiálu. Při validaci metod jsou využívány matriční referenční materiály, které slouží k nezávislému posouzení vychýlení metod [18].

2.6.1 Klasifikace a návaznost referenčních materiálů

Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) klasifikuje referenční materiály do dvou tříd, a to na certifikované referenční materiály (CRM) a referenční materiály (RM). Certifikované referenční materiály jsou referenční materiály, které obsahují certifikát zaručující, že jedna či více hodnot vlastností je získáno certifikovaných postupem. Tento postup zajišťuje návaznost k náležité realizaci jednotky, v níž jsou formulovány hodnoty vlastností. Každá certifikovaná hodnota musí obsahovat nejistotu měření charakterizující rozptyl hodnot při uvedené hladině spolehlivosti. Referenční materiály jsou látky charakteristické svou homogenitou a dobrou stanovitelností pro konkrétní analytický účel. Tyto aspekty jsou důležité pro využití referenčních materiálů ke kalibraci přístrojů, hodnocení měřících metod či k přiřazení hodnot materiálům. Referenční materiály lze také klasifikovat na primární referenční materiály, sekundární referenční materiály a interní nebo pracovní referenční materiály, které se liší svojí nejistotou [19].

Důležitá funkce referenčních materiálů spočívá v přenosu správnosti měření mezi různými laboratořemi, což je možné díky jejich vzájemné návaznosti. Návaznost je vlastnost výsledku měření nebo hodnoty standardu, které lze porovnat k určené referenci, jako je národní či mezinárodní standard, pomocí plynulého řetězce srovnávání. Hodnoty vlastností by měly být nejlépe navázány na jednotky SI, avšak návaznost je v chemickém měření poměrně novou záležitostí, a proto existuje velmi málo chemických referenčních materiálů explicitně navázaných na jednotky SI [15, 17, 19]. Návaznost nám tedy umožňuje porovnávat výsledky měření nehledě na hranice a nezávisle na čase [20].

2.6.2 Poptávka a nabídka referenčních materiálů

Vývoj nových analytických metod a jejich aplikace vyvolává velkou poptávku po referenčních materiálech v celosvětovém měřítku. Důležitým hnacím motorem pro výrobu a použití referenčních materiálů jsou neustále se objevující přísnější požadavky na akreditace laboratoří [21]. Výroba referenčních materiálů hraje významnou roli ve zlepšování a v podpoře uceleného celosvětového měřícího systému [20]. Dostupnost a výběr referenčních materiálů nepřevyšuje jejich poptávku, a proto si uživatel musí zvolit nejpříjemnější možnost z dostupné nabídky. Po celém světě se nachází několik set organizací vyrábějící desítky tisíc referenčních materiálů, mezi které se řadí mezinárodně uznávaný americký National Institute

of Standards and Technology [15, 17]. Dále existuje databáze Comar, která své uživatele informuje o referenčních materiálech připravené a certifikované v souladu s ISO 17034 [22]. V České republice je jedním z výrobců referenčních materiálů Český metrologický institut, který získal akreditaci na výrobu CRM pro zajištění metrologické návaznosti v oblastech měření pH, elektrolytické konduktivity a syntetických směsí plynů/par podle normy ČSN EN ISO 17034:2017 [23].

Aby byly získány kvalitní referenční materiály, musí být při výrobě dodržována řada požadavků. Tyto požadavky zahrnují například použití více testovacích metod při stanovení certifikované hodnoty, dlouhodobé studie stability, testování krátkodobé stability během přepravy či během velmi zvýšené teploty. Chemické laboratorní nádobí pro měření objemu, jako jsou byrety, pipety a odměrné baňky, jsou rovněž kontrolovány a kalibrovány [24].

Kvalitní referenční materiály jsou vyráběny náročným a drahým procesem, a proto vyžadují značné finanční, časové a lidské zdroje. Kvůli vysokým cenám komerčně dodávaných referenčních materiálů se laboratořím vyplácí vyrábět vlastní referenční materiály. Existují návody, které uživatele informují o výrobě referenčních materiálů v laboratořích, které nejsou na jejich výrobu specializovány. Před samotnou výrobou je vhodné uvážit několik klíčových faktorů, jako například výběr výchozího materiálu, testy homogenity a stability, odhad nejistoty či dokumentace a prokázání jakosti a návaznosti [15].

2.6.3 Vhodnost referenčních materiálů

Zásadním faktorem jakosti je nejistota spojená s certifikovanou hodnotou a spolehlivost jejího odhadu. Certifikované hodnoty by měly také obsahovat rozšířenou nejistotu U při využití koeficientu rozšíření $k = 2$, jenž udává hladinu spolehlivosti okolo 95 %. K celkové nejistotě měření přispívá nejistota spojená s měřením hodnoty vlastnosti referenčního materiálu využitého při měření. Tato dílčí nejistota by se neměla podílet na celkové nejistotě více než jednou třetinou. Jako příklad lze uvést referenční materiál s certifikovanou hodnotou 99,9 % a rozšířenou nejistotou $U = 0,1 \%$ ($k = 2$), která přispěje k celkové nejistotě dílčí nejistotou 0,1 %. Při kalibraci je obvykle jako referenční materiál používána čistá látka s určitou nejistotou, která nezahrnuje ostatní kroky metody, jako je rozpouštění vzorku a dělení stanovované složky. Dílčí nejistoty těchto kroků by měly být součástí validace metody [15].

Při výběru vhodného referenčního materiálu by se mělo dbát na přiměřenost a použitelnost pro určitý analytický požadavek a vzít v potaz následující okolnosti:

- měřenou veličinu
- rozsah měření (koncentrace)
- shodnost matrice a potenciální interference
- velikost vzorku
- homogenitu a stabilitu
- nejistotu měření
- postupy přiřazení hodnoty (měření a statistika) [16].

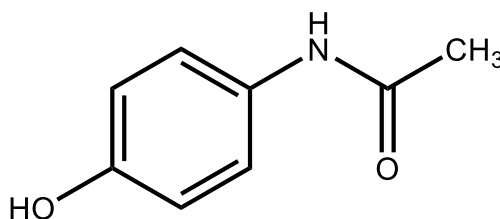
2.7 Hromadně vyráběné léčivé přípravky

Hromadně vyráběné léčivé přípravky jsou důležitou součástí léčivých přípravků, které jsou produkovány výrobcem v šaržích. Šarže obsahuje farmaceutické výrobky připravené v totožném výrobním cyklu či postupu, a proto vykazují vzájemnou stejnorodost. Na trhu jsou tyto produkty prodávány ve zvláštním obalu a pod zvláštním názvem. Registraci hromadně vyráběných léčivých přípravků v České republice vykonává dozor nad kvalitou a bezpečností léčiv, a to Státní ústav pro kontrolu léčiv a také Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. Registraci nepodléhají individuálně připravené léčivé přípravky, které tvoří druhou skupinu léčivých přípravků [25, 26].

Léčivý přípravek je chemická látka či kombinace chemických látek přírodního nebo syntetického původu, které mají léčebné a preventivní využití při onemocnění lidí nebo zvířat. Jejich farmakologické a imunologické vlastnosti pozitivně ovlivňují metabolismus, a tím slouží k obnově, úpravě či změně fyziologických funkcí. Pro farmaceutické a terapeutické účely jsou využívány léčivé přípravky získané technologickým zpracováním do různých lékových forem [25–27]. V roce 2023 bylo na českém trhu aktivně evidováno celkově 6588 hromadně vyráběných léčivých přípravků s různými účinnými látkami [28]. V této diplomové práci byly využity léčivé přípravky, a to konkrétně léčivé přípravky s obsahem účinné látky paracetamol a kodein, respektive kodein ve formě kodein-fosfát hemihydrát.

2.8 Paracetamol

Paracetamol (acetaminofen, 4-hydroxyacetanilid) patří mezi nejrozšířenější účinné látky používané v celosvětovém měřítku, a to převážně díky svým analgetickým a antipyretickým účinkům [29, 30]. Jedná se o bílý krystalický prášek, jenž je mírně rozpustný ve vodě, avšak lehce rozpustný v 96% ethanolu [31]. Strukturní vzorec paracetamolu je uveden na obr. 2.2, kde je znázorněn typický strukturní motiv pro *N*-acylovaný aromatický amin [32].



Obr. 2.2 Strukturní vzorec paracetamolu (upraveno podle [32]).

Syntéza paracetamolu byla poprvé uskutečněna Josephem von Meringem v roce 1893, reakcí *p*-nitrofenolu s cínem a ledovou kyselinou octovou [30, 33]. Od této doby je široce využívanou látkou v řadě terapeutických indikací, které zahrnují horečky a různé typy akutních bolestivých stavů (bolest hlavy, muskuloskeletální bolest, bolest při menstruaci, bolest zad či bolest zubů). Terapeutická dávka pro dospělé jedince zahrnuje dvě tablety po 500 mg paracetamolu, podané perorálně každé čtyři hodiny. U dětí standardní terapeutická dávka závisí na váze konkrétního jedince [30].

V mnoha zemích patří paracetamol mezi nejčastější látky u nichž dochází k předávkování, a to buď úmyslně či náhodně [34, 35]. Jednorázová dávka vyšší než 10 g nebo 150–200 mg kg⁻¹ má za následek těžkou hepatotoxicitu, selhání jater, selhání ledvin a dokonce i smrt. Menší dávky také nesou riziko poškození jater, a to u lidí trpících anorexií či u lidí s chronickou závislostí na alkoholu [29, 36]. Cytochrom P450 metabolizuje paracetamol za vzniku reaktivního toxického metabolitu *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu, který je příčinou toxicity paracetamolu [29, 32]. V závislosti na stavu jedince, existuje několik variant při léčbě otravy paracetamolem. Jednotlivé varianty zahrnují inhibici absorpce paracetamolu (aktivní uhlí, laváž žaludku), antidota zabraňující přeměnu na jeho toxický metabolit (cimetidin) a protilátky odstraňující *n*-acetyl-*p*-benzochinonimin (methionin, cystein a acetylcystein) [29, 34].

Paracetamol je velmi dobře snášen, což je hlavním faktorem širokého využití do různorodých léčivých přípravků [37]. Paracetamol je k dostání bez lékařského předpisu pod různými obchodními jmény, jako jsou Paralen, Panadol a Paramax RAPID [38–40]. Na českém trhu existuje paracetamol v několika lékových formách, a to především v tabletách. K dostání je však i jako čípek, prášek pro perorální roztok, perorální suspenze, infuzní roztok a šumivá granule [28].

2.8.1 Stanovení substance paracetamolu dle lékopisů

Dle Amerického lékopisu USP44 [41] lze stanovit paracetamol pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie za využití kolony typu C-18 (100×4,6 mm; 3,5 μm), která je temperována na teplotu 35 °C. Mobilní fáze je složena z methanolu a z roztoku připraveného rozpuštěním dvou látek, a to 1,7 g hydrogenfosforečnanu didraselného a 1,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného ve vodě a zředěného vodou na 1000,0 ml. Obsah paracetamolu je stanovován pomocí gradientové eluce při průtoku mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹. Konečná UV detekce probíhá při vlnové délce 230 nm. Nástříkový objem vzorku je 5,0 μl.

Ke stanovení paracetamolu je v Britském lékopisu 2020 [42] využita taktéž vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí při vlnové délce 254 nm. Mobilní fáze je složena ze dvou komponent. První složkou je zde roztok získaný rozpuštěním 1,7 g hydrogenfosforečnanu didraselného a 1,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného ve vodě a zředěného vodou na 1000,0 ml. Druhým komponentem je při této metodě methanol. Kolona C-18 (150×4,6 mm; 5 μm) je během gradientové eluce temperována na teplotu 30 °C. Nástříkový vzorek o objemu 50,0 μl protéká kolonou rychlostí 1,5 ml min⁻¹.

Evropský lékopis Ph. Eur. 11 [43] využívá ke stanovení obsahu paracetamolu také vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Je zde využita kolona C-18 (100×2,1 mm; 2,7 μm), jenž je temperována na teplotu 30 °C. Mobilní fáze obsahuje methanol a roztok získaný rozpuštěním 1,7 g hydrogenfosforečnanu didraselného a 1,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného ve vodě a zředěného vodou na 1000,0 ml. Průtok mobilní fáze během gradientové eluce je 0,3 ml min⁻¹. Stanovení je provedeno při vlnové délce 254 nm pomocí gradientové eluce.

Dle Českého lékopisu 2024 [31] lze paracetamol stanovit pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie za využití kolony C18 (250×4,6 mm; 5,0 μm), která je během stanovení temperována na teplotu 35 °C. Mobilní fáze je složena ze směsi 375,0 ml

dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného ($c = 17,9 \text{ g dm}^{-3}$), 375,0 ml dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($c = 7,8 \text{ g dm}^{-3}$) a 250,0 ml methanolu, který obsahuje tetrabutylamonium hydroxid ($c = 400,0 \text{ g dm}^{-3}$). Průtok mobilní fáze při isokratické eluce činí $1,5 \text{ ml min}^{-1}$.

Podle Českého lékopisu 2024 [31] a Evropského lékopisu Ph. Eur. 11 [43] lze paracetamol jako čistou substanci stanovit titračně. Vzorek o hmotnosti 0,300 g se rozpustí ve směsi 10,0 ml vody a 30,0 ml kyseliny sírové ($c = 98 \text{ g dm}^{-3}$). Následně se vzorek vaří pod zpětných chladičem. Po uplynutí jedné hodiny se vzorek ochladí a zředí na požadovaný objem 100,0 ml. Ke 20,0 ml připraveného vzorku se přidá 40,0 ml vody, 40 g ledu, 15,0 ml kyseliny chlorovodíkové ($c = 73 \text{ g dm}^{-3}$) a 0,1 ml indikátoru feroinu. Titrace je prováděna tetrasulfatoceričitanem amonným ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) do okamžiku, kdy vizuální indikátor feroin přejde do zelenožlutého zbarvení. Objem 1,0 ml síranu ceričitého odpovídá 7,56 mg paracetamolu.

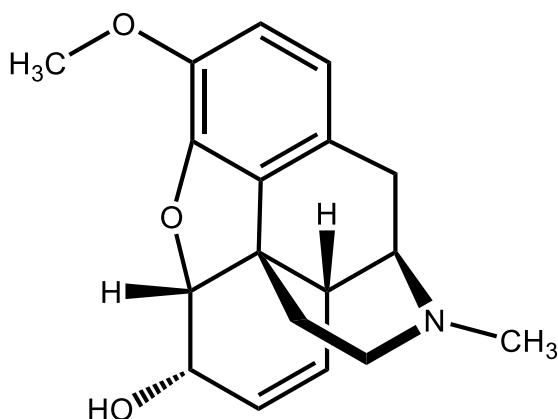
2.8.2 Stanovení paracetamolu v tabletách dle Amerického a Britského lékopisu

Stanovení paracetamolu v tabletách dle Amerického lékopisu USP44 [41] lze za pomoci metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí při vlnové délce 243 nm. Jako mobilní fáze je využit 1,0% roztok octové kyseliny ve vodě a methanol. Kolona C-18 ($100 \times 4,6 \text{ mm}$; $3,5 \text{ }\mu\text{m}$) je během experimentu zahřívána na teplotu $40 \text{ }^\circ\text{C}$ a mobilní fáze zde protéká rychlostí $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Nástřikový objem vzorku činí 10,0 μl . Obsah je stanovován pomocí gradientové eluce.

Dle Britského lékopisu 2022 [42] lze stanovit paracetamol v tabletách pomocí spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti. Nejprve se 20 tablet zváží a důkladně rozdrtí a zhomogenizuje. Navážka, která odpovídá 0,150 g paracetamolu, se kvantitativně převede do 50,0 ml hydroxidu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Do roztoku se následně přidá 100,0 ml vody a po dobu 15 minut je vzorek protřepáván. Po uplynutí určené doby je vzorek doplněn vodou na objem 200,0 ml a zfiltrován. Získaný filtrát o objemu 10,0 ml je zředěn vodou na objem 100,0 ml. Ze zředěného roztoku je dále odebrán vzorek o objemu 10,0 ml, který je smíchán s hydroxidem sodným ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) a doplněn vodou, aby celkový objem činil 100,0 ml. U výsledného vzorku je změřena absorbance při vlnové délce 257 nm.

2.9 Kodein

Kodein (3-methylmorfin) patří mezi opiové alkaloidy přirozeně se vyskytující v máku setém [44, 45]. Jedná se o bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, které jsou dobře rozpustné ve vroucí vodě a v 96% ethanolu [31]. Monohydrát kodeinu s chemickým vzorcem $C_{18}H_{21}NO_3 \cdot H_2O$ byl poprvé izolován francouzských chemikem Robiquetam v roce 1833 z máku setého, kde tvoří 0,5 % opia. V současnosti je výroba kodeinu používaného pro lékařské účely založena na methylaci morfinu. Strukturální vzorec sloučeniny 7,8-didehydro-4,5--epoxy-3-methoxy-17-methylmorfinan-6-ol je znázorněn na následujícím obr. 2.3 [31, 45].



Obr. 2.3 Strukturální vzorec kodeinu (upraveno dle [48]).

V lidském těle je kodein metabolizován na morfin, norkodein, kodein-6-glukuronid a morfin-6-glukuronid pomocí enzymů CYP2D6 a UGT2B7 [42, 46]. Léčivé přípravky obsahující kodein jsou využívány pro svoje analgetické, antitusické, antistresové a protiprůjmové účinky. Je převážně předepisován pro zvládnutí mírné až střední bolesti. Samotný kodein vykazuje oproti morfinu menší analgetické účinky, a to v poměru 1:10 [45]. Jeho široké využívání v medicíně je zapříčiněno nižšímu výskytu negativních účinků, a proto je často předepisován pro mladší věkové skupiny včetně novorozenců. Avšak enzym CYP2D6, který katalyzuje přeměnu kodeinu na morfin, existuje v několika různých genetických variantách. Tyto varianty ovlivňují množství vzniklého morfinu, což má za následek širokou škálu metabolických projevů v rámci celé populace [44, 47].

V roce 2023 bylo na českém trhu k dostání celkově sedm léčivých přípravků obsahující kodein [28]. Všechny tyto léčivé přípravky jsou vázány na lékařský předpis a jsou k dostání pod různými obchodními jmény, jako Ultracod, Korylan a Talvosilen forte. Léčivé přípravky jsou převážně ve formě tablet, které obsahují kodein ve formě kodein-fosfát hemihydrátu [48–51].

2.9.1 Stanovení substance kodein-fosfát hemihydrátu dle lékopisů

Dle Amerického lékopisu USP44 [41] lze kodein-fosfát hemihydrát stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí při vlnové délce 280 nm. Během stanovení je kolona C-18 (150,0×4,6 mm; 3,0 μm) temperována na teplotu 37 °C. Mobilní fáze je složena ze dvou komponent, a to z 2% kyseliny octové rozpuštěné ve vodě a z acetonitrilu. Vodná složka mobilní fáze je upravena pomocí 50% hydroxidu sodného na pH = 4,5. Obsah je stanovován pomocí gradientové eluce při průtoku mobilní fáze 1,88 ml min⁻¹.

Ke stanovení kodein-fosfát hemihydrátu dle Britského lékopisu 2022 [42] také slouží vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí, při které je využita gradientová eluce. Ke stanovení je použita kolona C-18 (75,0×3,0 mm; 1,9 μm), která je temperována na teplotu 40 °C. Mobilní fáze je složena z acetonitrilu a z roztoku složeného ze čtyřech objemových dílů acetonitrilu a 96 objemových dílů roztoku octové kyseliny ($c = 20,0 \text{ g dm}^{-3}$). Roztok octové kyseliny musí být nejprve upraven na pH = 4,5, a to za pomoci roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $c = 500,0 \text{ g dm}^{-3}$. Tato mobilní fáze proudí kolonou rychlostí 1,00 ml min⁻¹. Konečná UV detekce je provedena při vlnové délce 280 nm. Tento postup stanovení je totožně zaznamenán také v Evropském lékopisu Ph. Eur. 11 [43].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jako metoda ke stanovení kodein-fosfát hemihydrátu, je také využita v Českém lékopisu 2024 [31]. V Českém lékopisu je použita kolona C-18 (250,0×4,6 mm; 5 μm) a mobilní fáze složena z 1,080 g 1-oktansulfonátu sodného. Tato navážka je nejprve rozpuštěna ve směsi 20,0 ml 99% octové kyseliny a 250,0 ml acetonitrilu a poté je roztok doplněn vodou na objem 1000,0 ml. K detekci analytu je využit spektrofotometrický detektor při vlnové délce 245 nm a průtoková rychlost při isokratické eluci 2,00 ml min⁻¹.

Podle Českého lékopisu 2024 [31] a Evropského lékopisu Ph. Eur. 11 [43] lze kodein-fosfát hemihydrát jako čistou substanci stanovit rovněž titračně. V Českém lékopisu je nejprve 0,350 g substance rozpuštěno ve směsi 10,0 ml bezvodé octové kyseliny (nejméně 99,6 % octové kyseliny) a 20,0 ml dioxanu. Tato směs je dále titrována chloristou kyselinou ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) za využití krystalové violeti jako indikátoru. V Evropském lékopisu je postup lehce odlišný. Substance o hmotnosti 0,350 g je rozpouštěna v 50,00 ml bezvodé octové kyseliny. Takto připravený roztok je titrován chloristou kyselinou ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$), kdy konec titrace je stanoven pomocí potenciometrie. V Českém i v Evropském lékopisu odpovídá objemu 1,0 ml chloristé kyseliny 39,75 mg kodeinu-fosfát hemihydrátu.

2.9.2 Stanovení kodein-fosfát hemihydrátu v tabletách dle Amerického lékopisu

Stanovení kodein-fosfát hemihydrátu v tabletách dle Amerického lékopisu USP 44 [41] lze provést titračně. Nejprve se odváží a jemně rozdrtí alespoň 20 tablet. Z celkové hmotnosti se odváží taková navážka, která odpovídá 0,150 g kodein-fosfát hemihydrátu. Navážka je následně kvantitativně přenesena do 100,0ml odměrné baňky. Do odměrné baňky je přidána kyselina sírová o objemu 20,0 ml ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$) a během dvou hodin je směs příležitostně protřepána. Po uplynutí dvou hodin je baňka po rysku doplněna vodou, promíchána a zfiltrována přes filtrační kelímek. Filtrát, který odpovídá alespoň 0,075 g kodein-fosfát hemihydrátu je zalkalizován pomocí hydroxidu amonného. Následuje úplné extrahování alkaloidu za pomoci chloroformu, který se poté zcela odpaří na parní lázni. Ke vzorku se přidá 2,0 ml methanolu a methylová červeň, která slouží jako indikátor. Takto připravená směs je titrována kyselinou sírovou ($c = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$) do slabého růžového odstínu. Po získání růžového odstínu je do vzorku přidána čerstvě převařená, vychlazená voda ($V = 40,0 \text{ ml}$) a titrace pomocí kyseliny sírové je dokončena. Každý jeden ml sírové kyseliny odpovídá 8,128 mg kodein-fosfát hemihydrátu.

2.10 Jednotnost obsahu léčivých přípravků

Jedním z kritických atributů farmaceutické kvality léčivých přípravků je jednotnost obsahu aktivní farmaceutické složky. Jednotnost obsahu zajišťuje bezpečnost a účinnost léčivých přípravků, a to zejména u přípravků s úzkým terapeutickým indexem [52–54]. Tento kritický atribut zajišťuje, že obsah léčiva v různých šaržích se pohybuje v těsném rozmezí kolem tvrzení uvedené na etiketě [55]. Každý farmaceutický produkt musí být před uvedením do prodeje testován na jednotnost obsahu léčivého přípravku. Výsledky tohoto testu informují o rozložení aktivního obsahu v rámci jedné šarže [56]. Stejnomenost dávkových jednotek může být dokázána pomocí dvou metod, které zahrnují testování obsahové stejnoměrnosti či hmotnostní proměnlivosti. Jednotlivé testy jsou podrobně definovány v lékopisech. Zásadním cílem jakéhokoliv lékopisu je zajištění vysoké kvality výsledných lékových forem, a proto předepisují řadu testů kontroly kvality [57]. Zkouška obsahové stejnoměrnosti může být použita pro všechny lékové formy, avšak testování hmotností proměnlivosti lze aplikovat pouze na určité lékové formy [31, 41–43]. Na jednotnost obsahu léčivých přípravků může mít vliv několik faktorů, a to například velikost částic, distribuce velikosti aktivní farmaceutické složky, segregací částic během skladování či způsob lisování tablet [52–54].

2.10.1 Zkouška na obsahovou stejnoměrnost tablet dle lékopisů

Hlavním kritickým parametrem uvedení léčivého přípravku na trh je přijatelná obsahová stejnoměrnost, která musí vyhovovat požadavkům daných lékopisem [58]. V Americkém, Britském, Evropském a Českém lékopisu [31, 41–43] jsou požadavky na obsahovou stejnoměrnost účinných látek totožné. V lékopisech existují dva články týkající se hodnocení obsahové stejnoměrnosti, které slouží k prokázání rovnoměrného rozložení aktivního obsahu ve výrobní dávce [56, 57].

Vývojově starší článek popisuje zkoušku, která spočívá ve stanovení jednotlivých obsahů účinné látky v daném počtu tablet analyzovaného léčivého přípravku. Po stanovení obsahu léčivé látky se musí určit, zdali se jednotlivé obsahy nachází v povoleném rozsahu vzhledem k průměrné hodnotě obsahu. U multivitaminových přípravků a přípravků se stopovým množstvím účinné látky nelze tuto zkoušku aplikovat. Nejprve je náhodně vybráno celkově deset tablet, u kterých je vhodně zvolenou metodou stanoven obsah účinné látky. Vybraný léčivý přípravek splní zkoušku, pokud obsah každé jednotlivé tablety se nachází v rozmezí 85–115 % průměrného obsahu účinné látky. Přípravek nevyhovuje

zkoušce za podmínky, že jeden jednotlivý obsah účinné látky se nevyskytuje v rozmezí 75–125 % průměrného obsahu účinné látky. Taktéž nesplňuje zkoušku, pokud více než jeden jednotlivý obsah účinné látky se nachází mimo rozmezí 85–115 % průměrného obsahu účinné látky. V případě, že pouze jeden jednotlivý obsah léčivé látky se nalézá mimo interval 85–115 %, avšak žádný obsah účinné látky se nevyskytuje mimo rozmezí 75 % až 125 %, se musí zkouška provést pro dalších dvacet náhodně vybraných tablet analyzovaného léčivého přípravku. Tablety vyhovují zkoušce, jestliže obsahy účinných látek všech dvaceti tablet, se nacházejí v rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu léčivé látky [31, 41–43]. Avšak tato zkouška nezohledňuje fakt, že průměrný obsah účinné látky nemusí být správný. Tento nedostatek řeší vývojově novější zkouška, která bere v úvahu individuální odchylky jednotlivých vzorků a taktéž odchylku nalezeného průměrného obsahu od obsahu teoretického [59].

Nová zkouška je založena na dvoufázovém procesu využívající hodnoty přijatelnosti (AV). Nejprve je vybráno alespoň třicet jednotek analyzovaného léčivého přípravku. V první fázi je za pomoci vhodné analytické metody jednotlivě stanoven obsah deseti jednotek pevné lékové formy. Získané hodnoty deseti obsahů slouží k výpočtu hodnoty přijatelnosti dle vzorce

$$AV = |M - \bar{X}| + ks \quad (2.13)$$

kde AV je hodnota přijatelnosti, M je referenční hodnota, \bar{X} je průměr jednotlivých obsahů (x_1, x_2, \dots, x_n) [%], k je konstanta přijatelnosti a s je směrodatná odchylka vzorku [%].

Pokud nastane situace, že hodnota AV překročí kritérium, musí proces vstoupit do druhé fáze, kde je testováno dalších 20 jednotek analyzovaného léčivého přípravku [60].

Referenční hodnota, která nabývá hodnot od 98,5–101,5 %, závisí na cílové hodnotě obsahu na dávkovou jednotku v době výroby. Tato hodnota, v lékopisu značená T , je vyjádřena jako procento hodnoty napsané na obalu, nejčastěji T odpovídá 100 %. Další faktor, který ovlivňuje referenční hodnotu, je výsledný průměr jednotlivých obsahů, který je vyjádřený v procentech hodnoty označené na obalu. Konstanta přijatelnosti je závislá na velikosti vzorku. Je-li počet dávkových jednotek ve vzorku deset, pak konstanta nabývá hodnoty 2,4. Při výpočtu hodnoty přijatelnosti pro třicet jednotek je hodnota konstanty přijatelnosti 2,0 [31, 41–43].

Pevné, polotuhé či tekuté lékové formy vyhovují zkoušce, pokud hodnota přijatelnosti u deseti zvolených jednotek je menší nebo rovna 15 %. Jestliže kritérium není splněno, musí být otestováno dalších 20 jednotek, ze kterých je taktéž vypočtena hodnota přijatelnosti. Požadavky jsou splněny, pokud výsledná hodnota přijatelnosti pro třicet jednotek je menší nebo rovna 15 % a zároveň se každý jednotlivý obsah dávkové jednotky vyskytuje v rozmezí $(1 - 15 \cdot 0,01) \cdot M$ až $(1 + 15 \cdot 0,01) \cdot M$ [59].

2.10.2 Zkouška na hmotnostní proměnlivost tablet dle lékopisů

Další možností testování stejnoměrnosti dávkových jednotek je pomocí testu na hmotnostní proměnlivost, který lze aplikovat pouze na určité lékové formy. Opět existují v lékopisech dvě odlišné formy testování hmotnostní proměnlivosti, které se od sebe lehce odlišují.

Vývojově starší článek popisuje zkoušku, která spočívá ve stanovení jednotlivých hmotností vybrané lékové formy. Po stanovení dílčích hmotností léčivé látky se určí, zdali se jednotlivé hmotnosti nachází v povolené odchylce vzhledem k průměrné hodnotě hmotnosti. U tablet je nejprve náhodně vybráno celkově dvacet tablet, které se jednotlivě zváží a ze získaných hmotností se vypočítá průměr. Zkouška je splněna v situaci, kdy nejvýše dvě hmotnosti se liší od stanovené odchylky a zároveň žádná jednotlivá hmotnost se od průměru hmotností tablet neliší více než dvojnásobek odchylky. Jednotlivé odchylky závisí na druhu lékové formy a průměrné hmotnosti [31, 41–43]. Opět tato vývojově starší zkouška nezohledňuje možnost, že zjištěná průměrná hmotnost nemusí být správná a taktéž opomíjí dávku, podíl léčivé látky, typ a podtyp lékové formy. Tento nedostatek řeší vývojově novější zkouška, která je taktéž součástí lékopisů [59].

Vývojově novější zkouška hmotnostní proměnlivosti zohledňuje lékovou formu, typ, podtyp, dávku a podíl léčivé látky v lékové formě. U všech tablet s obsahem účinné látky menší než 25,0 mg nebo podílem léčivé látky menší než 25,0 % je vyžadována zkouška na obsahovou stejnoměrnost [57]. Dále nelze zkoušku na hmotnostní proměnlivost aplikovat u potahovaných tablet, které nejsou potaženy filmem. Zkouška je opět založena na dvoufázovém procesu využívající hodnoty přijatelnosti (*AV*). Pomocí vhodné analytické metody je nejprve stanoven obsah léčivé látky u reprezentativního vzorku šarže. Do výpočtu hodnoty přijatelnosti je změřená hodnota obsahu dosažena jako procento obsahu uvedeného v označení na obalu. V první fázi procesu je náhodně vybráno třicet tablet (neobalené nebo filmem potažené tablety). Celkem u deseti náhodně vybraných tablet se jednotlivě přesně zjistí hmotnost. Pomocí hmotnosti jednotlivých tablet a výsledku stanovení obsahu

se vypočítá obsah léčivé látky, který je vyjádřený jako procento obsahu uvedeného na obalu léčivého přípravku [31, 41–43]. K výpočtu hodnoty přijatelnosti je využit totožný vzorec, který je uveden u obsahové stejnoměrnosti (2.13), s tou výjimkou že jednotlivé obsahy jsou nahrazeny dílčími obsahy, které jsou vypočteny dle vzorce

$$x_i = w_i \cdot \frac{A}{\bar{W}} \quad (2.14)$$

kde x_i je obsah dávkové jednotky [%], w_i je hmotnost jedné tablety [g], A je obsah léčivé látky [%] a \bar{W} je průměr jednotlivých hmotností [g].

Pokud nastane situace, že hodnota AV překročí kritérium, musí proces vstoupit do druhé fáze, kde je testováno dalších dvacet jednotek analyzovaného léčivého přípravku. Tablety vyhovují zkoušce, pokud hodnota přijatelnosti u deseti zvolených jednotek je menší nebo rovna 15 %. Jestliže kritérium není splněno, musí být otestováno dalších dvacet jednotek, ze kterých je také vypočtena hodnota přijatelnosti. Požadavky jsou splněny, pokud výsledná hodnota přijatelnosti pro třicet jednotek je menší nebo rovna 15 % a zároveň se každý jednotlivý obsah dávkové jednotky vyskytuje v rozmezí $(1 - 15 \cdot 0,01) \cdot M$ až $(1 + 15 \cdot 0,01) \cdot M$ [31, 41–43].

2.10.3 Obsah účinné látky v tabletách dle lékopisů

Zásadním kritériem kvality konečného farmaceutického produktu je obsah účinné látky, který je definován lékopisem. Obsah účinné látky se musí nacházet v přípustném rozmezí od hodnoty uvedené na etiketě léčivého produktu. Monografie Evropského lékopisu popisuje aktivní farmaceutickou složku individuálně a o tabletách jsou k dispozici pouze obecné popisy. Dle toho nemůže žádný farmaceutický přípravek v Evropské unii překročit limit $\pm 5 \%$ od hodnoty uvedené na etiketě [56].

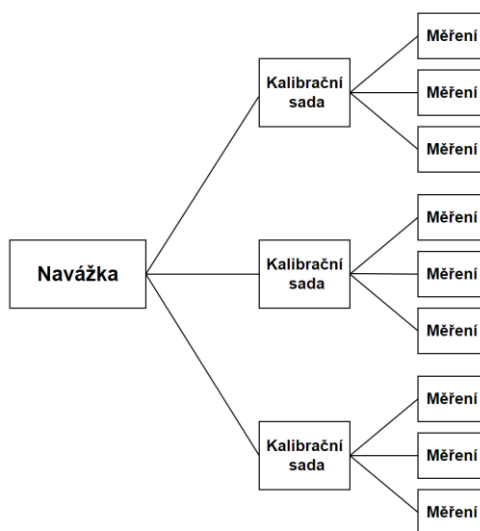
V Americkém lékopisu [41] jsou monografie publikovány pro farmaceutické výrobky jednotlivě. Dle Amerického lékopisu je povolený obsah účinné látky v jednotlivých tabletách v rozmezí 90–110 % vzhledem k hodnotě uvedené na etiketě. Kritéria přijatelnosti zkoušky mohou být u některých léčivých přípravků odlišné, a to například z důvodu úzkého terapeutického indexu. V těchto případech platí, že odchylka stanovovaného obsahu může být $\pm 5 \%$ od hodnoty uvedené na etiketě (například warfarin) [58, 61].

2.11 Východiska řešení diplomové práce

Referenční materiály patří mezi hlavní nástroje využívané k realizaci řady měření v analytické chemii. Avšak jejich dostupnost v celosvětovém měřítku není ideální a dodací čas může být i více než několik týdnů. V této diplomové práci je testováno, zdali lze využít vybrané hromadně vyráběné léčivé přípravky, jako alternativní zdroj referenčních materiálů (ARMP) v analytické kalibraci, a to vzhledem k tomu, že – jak bylo právě uvedeno – se jedná o materiály s velmi přísně kontrolovaným obsahem účinných látek. Hromadně vyráběné léčivé přípravky tak mohou být vhodnou alternativou v momentech, kdy hraje zásadní roli čas, jako je například klinické vyšetřování intoxikace. Převážně v situacích, kdy není ihned po ruce dostupný analytický referenční materiál. Navíc v těchto případech se často vyšetřují předávkování léčivých přípravků. Hromadně vyráběné léčivé přípravky lze koupit v každé lékárně, a tudíž jsou oproti referenčním materiálům snadno dostupné.

2.12 Schéma přípravy a měření kalibračních roztoků

V této diplomové práci byly testovány vlivy několika faktorů (měřicí přístroj, příprava kalibračních roztoků a vážení) na parametry kalibračních závislostí u RMP a ARMP. Testování bylo provedeno na kalibračních roztocích, které byly připraveny dle schématu na obr. 2.4. Vždy byly odváženy tři navážky, ze kterých byly připraveny tři zásobní roztoky. Z každého zásobního roztoku byly připraveny tři kalibrační sady. Každá kalibrační sada byla změřena třikrát neboli z každé navážky bylo získáno celkově devět kalibračních závislostí.



Obr. 2.4 Schéma přípravy a měření kalibračních roztoků.

3 Experimentální část

3.1 Referenční materiály studovaných léčivých látek

V této diplomové práci byly využity referenční materiály paracetamolu a kodeinu, které jsou dále označovány následujícími zkratkami:

- *CRMP*: Certifikovaný referenční materiál paracetamolu, Paracetamol CRS, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (France), kód P0300000, série 4.1, ID 03J952.
- *RMP*: Referenční materiál paracetamolu, Sigma-Aldrich (USA), ID 061M0042V.
- *RMK*: Referenční materiál kodeinu, CODEINI PHOSPHAS HYDRICUS, nemocniční lékárna fakultní nemocnice v Motole (Praha), č. certifikované K01445/0323/536, použitelné do 07/2024.

3.2 Analyzované hromadně vyráběné léčivé přípravky

Jako možné alternativní zdroje referenčních materiálů pro kalibraci byly vybrány následující léčivé přípravky, které jsou v experimentální části značeny pomocí zkratk. Vybrané hromadně vyráběné léčivé přípravky jsou rozděleny na alternativní referenční materiály paracetamolu (značeny ARMP), alternativní referenční materiály kodeinu (značeny ARMK), a dále alternativní referenční materiály obsahující paracetamol i kodein, které jsou popsány zkratkou ARMPK:

- *ARMP1*: Panadol Novum 500 mg, GlaxoSmithKline (Anglie), číslo šarže E42J, použitelné do 05/2025.
- *ARMP2*: Paramax RAPID 500 mg, VITABALANS (Finsko), číslo šarže 1113201, použitelné do 11/2026.
- *ARMP3*: Paramax RAPID 500 mg, VITABALANS (Finsko), číslo šarže 1111301, použitelné do 07/2027.
- *ARMP4*: Paramax RAPID 1 g, VITABALANS (Finsko), číslo šarže 1351004, použitelné do 01 2024.
- *ARMP5*: Paralen 500 mg, Opella Healthcare Czech (Česká republika), číslo šarže FV136, použitelné do 09/2025.
- *ARMK1*: Codein SLOVAKOFARMA 30 mg, Seneca Pharmaceuticals (Slovensko), číslo šarže 3020521, použitelné do 04/2024.

- *ARMPK1*: TALVOSILEN, Bene-Arzneimittel (Německo), číslo šarže 704B232, použitelné do 12/2027.

3.3 Použité chemikálie

- Acetonitril, HPLC Supra-Gradient (Biosolve Chimie, Francie)
- Deionizovaná voda o měrné vodivosti $<0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$, získaná přístrojem Milli-Q (Millipore, USA)
- Methanol, HPLC Supra-Gradient (Biosolve Chimie, Francie)
- *o*-fosforečná kyselina, $\leq 85 \%$ p.a. (Lach:ner, Česká republika)

3.4 Použité přístroje

Měření bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí při vlnové délce 244 nm pro paracetamol a 210 nm pro kodein. Měření byla uskutečněna na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko) s detektorem s diodovým polem. Kolona XBridge BEH C-18 (100×3,5 mm: 2,5 μm) byla temperována na teplotu 35 °C. Mobilní fáze byla složena z deionizované vody o pH = 2,5 (upraveno pomocí fosforečné kyseliny) v poměru 1:3 pro stanovení paracetamolu ($V_{\text{nástřik}} = 2,0 \mu\text{l}$) a 1:9 pro stanovení kodeinu ($V_{\text{nástřik}} = 5,0 \mu\text{l}$). Průtok mobilní fáze při isokratické eluci činil 0,4 ml min^{-1} . Podmínky pro simultánní stanovení paracetamolu a kodeinu byly stejné jako pro kodein samotný (pro paracetamol byl $V_{\text{nástřik}} = 2,0 \mu\text{l}$, pro kodein $V_{\text{nástřik}} = 5,0 \mu\text{l}$).

Ke zjištění stability roztoků bylo využito spektrometrické měření v UV oblasti. Byl použit jednopaprskový spektrometr HP 8453 s diodovým polem firmy Hewlett Packard. Měření probíhalo v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Absorpční spektrum bylo měřeno od 200 do 400 nm.

3.5 Pracovní postupy

3.5.1 Stanovení paracetamolu

3.5.1.1 Příprava roztoků

1. Zásobní roztok CRMP byl získán odvážením 0,0100 g CRMP. Tato navážka byla rozpuštěna v 10,00ml odměrné baňce pomocí methanolu. Koncentrace paracetamolu činila $1,00 \text{ g dm}^{-3}$.
2. Zásobní roztok 100% RMP o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ byl připraven odvážením 0,1000 g RMP, který byl kvantitativně převeden do 100,0ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna po rysku methanolem.
3. Zásobní roztok 90% RMP byl připraven navážením 0,0900 g RMP. Navážka byla následně kvantitativně převedena a rozpouštěna v methanolu ve 100,0ml odměrné baňce. Koncentrace paracetamolu v tomto zásobním roztoku činila $0,900 \text{ g dm}^{-3}$.
4. Zásobní roztok 110% RMP o koncentraci $1,10 \text{ g dm}^{-3}$ byl zhotoven odvážením 0,1100 g RMP. Navážka byla kvantitativně převedena do 100,0ml odměrné baňky. Baňka byla následně doplněna po rysku methanolem.

3.5.1.2 Spektrometrické testování stability u RMP

K testování stability roztoku paracetamolu rozpuštěného v methanolu byla připravena kalibrační řada v rozsahu koncentrací $1\text{--}25 \text{ g dm}^{-3}$. Navážka o hmotnosti 0,0100 g RMP byla kvantitativně převedena do 100,0ml odměrné baňky, které byla následně po rysku doplněna methanolem. Tento roztok byl odpipetován po objemech 0,50, 2,50, 5,00, 7,50 a 10,00 ml do 50,00ml odměrných baněk. Všechny baňky byly po rysku doplněny methanolem. Kalibrační vzorky byly celkově pomocí spektrometru změřeny devětkrát, a to vždy odlišný den.

3.5.1.3 Měření HPLC-UV kalibračních závislostí pro CRMP a RMP

Nejprve byla vytvořena sada pěti roztoků o odlišné koncentraci připravená ze zásobního roztoku CRMP o koncentraci paracetamolu $1,00 \text{ g dm}^{-3}$. Sada roztoků byla připravena do 10,00ml odměrných baněk. Do odměrných baněk byl odpipetován roztok CRM o objemu 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 a 1,00 ml. Obsah všech baněk byl doplněn po rysku methanolem. Pro získání kalibrační závislosti pomocí metody HPLC byly roztoky vždy převedeny do vialek a poté uzavřeny víčkem se septem. Každý jednotlivý vzorek byl změřen třikrát.

Ze zásobních roztoků RMP o koncentraci 0,900, 1,00 a $1,10 \text{ g dm}^{-3}$ (= 90% RMP, 100% RMP a 110% RMP) byly totožně připraveny kalibrační roztoky o různých koncentracích. Do 10,00ml odměrných baněk byl odpipetován zásobní roztok paracetamolu o objemu 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 a 1,00 ml pro každý zásobní roztok o odlišné koncentraci. Všechny odměrné baňky byly následně doplněny methanolem po rysku. Obsah baněk byl převeden do vialek a uzavřen víčkem se septem. Každý zásobní roztok paracetamolu o koncentraci 0,900, 1,00 a $1,10 \text{ g dm}^{-3}$ byl připraven třikrát. Z jednotlivých zásobních roztoků byly kalibrační sady připraveny v tripletech a následně byl každý vzorek stanoven třikrát.

3.5.1.4 Měření HPLC-UV kalibračních závislostí pro ARMP

Celkově bylo připraveno z ARMP2 šest zásobních roztoků. Tři zásobní roztoky byly připraveny ze třech různých tablet. Zbývající zásobní roztoky byly vždy získány zhomogenizováním třech tablet. Jednotlivé hmotnosti tablet jsou zaznamenány v tab. 3.1. Z každého zásobního roztoku byla kalibrační sada roztoků připravena v tripletech. Následně byly jednotlivé obsahy vialek vždy změřeny třikrát. Z ARMP2 byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci paracetamolu $1,00 \text{ g dm}^{-3}$. Nejprve byla zvážena jedna tableta, která byla poté důkladně rozdrcena. Z rozdrcené tablety byla odebrána 1/5 celkové hmotnosti tablety a kvantitativně převedena do 100,0ml odměrné baňky a poté doplněna methanolem po rysku. Pro rychlejší rozpouštění byla baňka po dobu 15 minut ponechána v ultrazvuku. Po uplynutí určené doby byl roztok z filtrován pomocí filtračního papíru. Získaný filtrát byl odpipetován do 10,00ml odměrných baněk po objemech 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 a 1,00 ml. Všechny odměrné baňky byly doplněny methanolem po rysku. Roztoky byly převedeny do vialek a uzavřeny víčkem se septem.

Další sada roztoků byla připravena ze tří tablet ARMP2. Tři tablety byly zváženy a důkladně zhomogenizovány. Z celkové hmotnosti tří tablet byla odebrána 1/15, která odpovídá hmotnosti odebrané z jedné tablety. Tento alikvot tří tablet byl kvantitativně převeden do 100,0ml odměrné baňky a rozpuštěn v methanolu. Odměrná baňka byla vložena do ultrazvuku po dobu 15 minut. Následně byl roztok zfiltrován pomocí filtračního papíru. Z filtrátu byla připravena sada pěti roztoků o odlišné koncentraci. Do 10,00ml odměrných baněk bylo odpipetováno ze získaného filtrátu 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 a 1,00 ml. Následně byly všechny vzorky doplněny po rysku methanolem a převedeny do vialek, které byly poté uzavřeny víčkem se septem.

Z ARMP1, ARMP3 a ARMP5 byly připraveny dva zásobní roztoky o koncentraci 1,00 g dm⁻³. První zásobní roztok byl připraven z jedné tablety těchto léčivých přípravků. Nejprve byla tableta důkladně zhomogenizována. Do 100,0ml odměrné baňky byla kvantitativně převedena 1/5 z celkové hmotnosti tablety. Odměrná baňka byla po rysku doplněna methanolem a přesunuta do ultrazvuku po dobu 15 minut. Druhý zásobní roztok byl připraven za využití tří tablet. Nejprve byly všechny tři tablety zváženy. Z celkové hmotnosti tří tablet byla odebrána 1/15 do 100,0ml odměrné baňky. Rozpuštění navážky bylo urychleno vložím odměrné baňky do ultrazvuku po dobu 15 minut. Oba zásobní roztoky byly zfiltrovány pomocí filtračního papíru. Ze získaných filtrátů byly připraveny dvě sady pěti roztoků o odlišné koncentraci. Do 10,00ml odměrných baněk byl odpipetován filtrát o objemu 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 a 1,00 ml. Obsah všech odměrných baněk byl po rysku doplněn methanolem a přesunut do vialek, které byly následně uzavřeny víčkem se septem. Z obou zásobních roztoků byla připravena jedna kalibrační řada, která byla změřena třikrát.

Z léčivého přípravku ARMP4 byly připraveny dva zásobní roztoky o totožné koncentraci 1,00 g dm⁻³. Nejprve byla zvážena samotná tableta. Tableta byla důkladně rozdrcena a zhomogenizována. Z rozdrcené tablety byla odebráno 1/10 hmotnosti celé tablety a přesunuta do 100,0ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna po rysku methanolem. Poté byly zváženy tři tablety, které byly následně rozdrceny a zhomogenizovány. Z celkové hmotnosti tří tablet byla odebrána 1/30 hmotnosti. Tato část tablet byla kvantitativně převedena do 100,0ml odměrné baňky a rozpouštěna v methanolu pomocí ultrazvuku po dobu 15 minut. Oba zásobní roztoky byly zfiltrovány a ze získaného filtrátu byly vytvořeny dvě kalibrační sady roztoků o odlišných koncentracích. Filtrát o objemu 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 a 1,00 ml byl převeden do 10,00ml odměrných baněk. Baňky byly následně doplněny methanolem po rysku a jejich obsah byl přesunut do vialek s uzávěry se septem.

Obě kalibrační sady byly změřeny třikrát. Všechny navážky jednotlivých alternativních referenčních materiálů jsou zaznamenány v tab. 3.1.

Tabulka 3.1

Navážky pro vybrané ARMP použité k přípravě zásobních roztoků o koncentraci paracetamolu $1,00 \text{ g dm}^{-3}$.

Materiál, obsah účinné látky	Počet tablet	Navážka	$m_{\text{celkem}} / \text{g}$	$m_{\text{odebraná}} / \text{g}$
ARMP1, 500 mg/tbt	1	1	0,6760	0,1352
	3	1	2,0299	0,1353
ARMP2, 500 mg/tbt	1	1	0,6656	0,1331
		2	0,6685	0,1337
		3	0,6645	0,1329
	3	1	1,9865	0,1324
		2	1,9858	0,1324
ARMP3, 500 mg/tbt	1	1	0,6694	0,1339
		3	2,0035	0,1336
		1	1,3324	0,1332
ARMP4, 1000 mg/tbt	3	1	3,9835	0,1378
	1	1	0,5443	0,1089
ARMP5, 500 mg/tbt	3	1	1,6213	0,1081

3.5.2 Stanovení kodeinu

3.5.2.1 Příprava roztoku

- Zásobní roztok RMK o koncentraci $0,300 \text{ g dm}^{-3}$ byl zhotoven odvážením $0,0300 \text{ g}$ RMK. Navážka byla kvantitativně převedena do $100,0 \text{ ml}$ odměrné baňky. Baňka byla následně doplněna po rysku methanolem.

3.5.2.2 Měření kalibračních závislostí pro RMK

Ze zásobního roztoku RMK o koncentraci $0,300 \text{ g dm}^{-3}$ byly vytvořeny kalibrační vzorky o odlišných koncentracích. Do $10,00 \text{ ml}$ odměrných baněk byl odpipetován zásobní roztok kodeinu o objemu $0,80$, $1,50$, $2,00$, $3,00$ a $4,50 \text{ ml}$. Jednotlivé baňky byly doplněny po rysku methanolem a jejich objem byl přesunut do vialek, které byly následně uzavřeny víčky se septem. Celá kalibrační sada roztoků byla vždy změřena třikrát.

3.5.2.3 Měření kalibračních závislostí pro ARMK

Z hromadně vyráběného léčivého přípravku ARMK1 byly připraveny dva zásobní roztoky o koncentraci $0,300 \text{ g dm}^{-3}$. První zásobní roztok byl připraven z jedné tablety tohoto léčivého přípravku. Tableta byla pomocí ultrazvuku rozpuštěna ve $100,0 \text{ ml}$ odměrné baňce, která byla naplněna po rysku methanolem. Druhý zásobní roztok byl zhotoven z celkově tří tablet. Nejprve byly tablety zváženy a poté důkladně rozdrceny a zhomogenizovány. Navážka odpovídající hmotnosti jedné tablety byla kvantitativně přesunuta do $100,0 \text{ ml}$ odměrné baňky a doplněna methanolem po rysku. Pro rychlejší rozpuštění byla odměrná baňka ponechána po dobu 15 minut v ultrazvuku. Po uplynutí určené doby byly oba zásobní roztoky z filtrovány pomocí filtračního papíru. Získaný filtrát byl odpipetován do $10,00 \text{ ml}$ odměrných baněk po objemech $0,80$, $1,50$, $2,00$, $3,00$ a $4,50 \text{ ml}$. Všechny odměrné baňky byly doplněny methanolem po rysku a poté byl jejich obsah přesunut do vialek, které byly uzavřeny víčky se septem. Každý jednotlivý vzorek byl vždy změřen třikrát. Všechny navážky jsou zaznamenány v tab. 3.2.

Tabulka 3.2

Navážky pro ARMK1 použité k přípravě zásobních roztoků o koncentraci kodeinu $0,300 \text{ g dm}^{-3}$.

Počet tablet	$m_{\text{celkem}} / \text{g}$	$m_{\text{odebraná}} / \text{g}$
1	0,1506	0,1506
3	0,4559	0,1516

3.5.3 Simultánní stanovení paracetamolu a kodeinu

Alternativní referenční materiál (ARMPK1) Talvosilen ve svém složení obsahuje obě zmíněné účinné látky, a to paracetamol a kodein. Z důvodu změn v experimentálních podmínkách, týkajících se poměru mobilní fáze a nástřikového objemu, muselo dojít k opětovnému měření kalibrační závislosti u CRMP za totožných experimentálních podmínek jako u stanovení samotného kodeinu ($V_{\text{nástřik,par}} = 5,0 \text{ } \mu\text{l}$). Kalibrační závislosti zaležené na RMK byly změřeny za stejných experimentálních podmínek jako u ARMK.

3.5.3.1 Příprava roztoků

1. Zásobní roztok CRMP byl získán odvážením $0,0100 \text{ g}$ CRMP. Tato navážka byla rozpuštěna v $10,00 \text{ ml}$ odměrné baňce pomocí methanolu. Koncentrace paracetamolu činila $1,00 \text{ g dm}^{-3}$.
2. Zásobní roztok RMK o koncentraci $0,300 \text{ g dm}^{-3}$ byl zhotoven odvážením $0,0300 \text{ g}$ RMK. Navážka byla kvantitativně převedena do $100,0 \text{ ml}$ odměrné baňky. Baňka byla následně doplněna po rysku methanolem.

3.5.3.2 Měření kalibračních závislostí pro CRMP a RMK

Nejprve byla vytvořena sada pěti roztoků o odlišné koncentraci připravená ze zásobního roztoku CRMP o koncentraci paracetamolu $1,00 \text{ g dm}^{-3}$. Sada roztoků byla připravena do $10,00 \text{ ml}$ odměrných baněk. Do odměrných baněk byl odpipetován roztok CRM o objemu $0,05, 0,10, 0,25, 0,50$ a $1,00 \text{ ml}$. Obsah všech baněk byl doplněn po rysku methanolem. Pro získání kalibrační závislosti pomocí metody HPLC byly roztoky vždy převedeny do vialek a poté uzavřeny víčkem se septem. Každý jednotlivý vzorek byl změřen třikrát.

Ze zásobního roztoku RMK o koncentraci $0,300 \text{ g dm}^{-3}$ byly vytvořeny kalibrační vzorky o odlišných koncentracích. Do 10,00ml odměrných baněk byl odpipetován zásobní roztok kodeinu o objemu 0,80, 1,50, 2,00, 3,00 a 4,50 ml. Jednotlivé baňky byly doplněny po rysku methanolem a jejich objem byl přesunut do vialek, které byly následně uzavřeny víčky se septem. Celá kalibrační sada roztoků byla vždy změřena třikrát.

3.5.3.3 Měření kalibračních závislostí u ARMPK

Alternativní referenční materiál, značený zkratkou ARMPK1, ve svém složení obsahuje dvě účinné látky, a to konkrétně paracetamol a kodein. Z tohoto důvodu byly celkově připraveny čtyři zásobní roztoky o dvou různých koncentracích. Dva zásobní roztoky, připravené z jedné a ze tří tablet, obsahovaly kodein v koncentraci $0,300 \text{ g dm}^{-3}$. Zbylé dva zásobní roztoky, též připraveny z jedné a ze tří tablet, obsahovaly paracetamol v koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$.

Při přípravě zásobních roztoků o koncentraci kodeinu $0,300 \text{ g dm}^{-3}$ byla nejprve zvážena jedna tableta, která byla následně rozpuštěna ve 100,0ml odměrné baňce pomocí methanolu. Dále byly zváženy tři tablety. Po jejich rozdrcení a zhomogenizování byla 1/3 hmotnosti převedena do 100,0ml odměrné baňky a doplněna po rysku methanolem. Roztoky ze zásobních roztoků byly zfiltrvány a jejich filtrát byl využit na přípravu dvou kalibračních řad. Filtrát o objemu 0,80, 1,50, 2,00, 3,00 a 4,50 ml byl převeden do 10,00ml odměrných baněk. Baňky byly následně doplněny methanolem po rysku a jejich obsah byl přesunut do vialek s uzávěry se septem. Obě kalibrační sady byly pomocí HPLC přístroje vždy změřeny třikrát (nástříkový objem roztoku 5,0 μl).

Zásobní roztok o koncentraci paracetamolu $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ byl připraven odvážením jedné tablety ARMPK1. Navážka, která odpovídá 1/5 celkové hmotnosti tablety, byla kvantitativně přesunu do 100,0ml odměrné baňky, kde následně byla rozpuštěna v methanolu. Druhý zásobní roztok o koncentraci paracetamolu $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ byl připraven ze tří tablet ARMPK1. K přípravě tohoto zásobního roztoku byla použita 1/15 hmotnosti z celkově tří tablet. Tento alikvot byl kvantitativně přesunut do 100,0ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku methanolem a vložena za účelem rychlejšího rozpuštění do ultrazvuku. Oba roztoky byly zfiltrvány a jejich filtrát využit na přípravu dvou kalibračních řad o koncentraci 5,00, 10,00, 25,00, 50,00 a $100,0 \text{ g dm}^{-3}$. Filtrát o objemu 0,05,

0,10, 0,25, 0,50 a 1,00 ml byl převeden do 10,00ml odměrných baněk. Obě kalibrační sady byly pomocí HPLC přístroje vždy změřeny třikrát (nástrikový objem roztoku 2,0 μ l).

Všechny navážky využitě k přípravě čtyř zásobních roztoků jsou uvedeny v tab. 3.3.

Tabulka 3.3

Navážky pro ARMPK1 použité k přípravě zásobních roztoků o koncentraci kodeinu 0,300 g dm^{-3} , resp. koncentraci paracetamolu 1,00 g dm^{-3} .

Látka	Počet tablet	$m_{\text{celkem}} / \text{g}$	$m_{\text{odebraná}} / \text{g}$
Kodein	1	0,5870	0,5870
	3	1,7757	0,5919
Paracetamol	1	0,5767	0,1155
	3	1,7757	0,1185

3.6 Statistické zhodnocení dat

K vyhodnocování získaných dat byly využity dva druhy statistického testování hypotéz, a to analýza rozptylu a Studentův jednovýběrový t -test.

Jednofaktorová analýza rozptylu slouží k testování hypotéz skládající se z více než dvou sledovaných skupin. Analýza rozptylu využívá srovnání pozorované variability mezi výběry a pozorované variability uvnitř výběrových souborů. Aplikace analýzy rozptylu je podmíněna několika předpoklady, jako jsou normalita hodnot jednotlivých výběrových souborů a taktéž srovnatelným rozptylem v jednotlivých skupinách. Nulová hypotéza očekává, že všechny pozorované skupiny mají stejnou střední hodnotu μ

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k \quad (3.1)$$

Tato hypotéza je přijata v případě, kdy výsledná hodnota F nabývá nižších hodnot než tabulková kritická hodnota F_{krit} [11].

Při aplikaci analýzy rozptylu byly využity následující vztahy:

a) variabilita mezi skupinami

$$S_A = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2 \quad (3.2)$$

b) variabilita v rámci skupin (reziduální součet čtverců)

$$S_e = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (3.3)$$

c) výsledná hodnota F

$$F = \frac{S_A}{k + 1} \cdot \frac{n - k}{S_e} \quad (3.4)$$

kde S_A je variabilita mezi skupinami, S_e je variabilita v rámci skupin, k je počet populací (skupin), n je počet pozorování, \bar{y} představuje průměr všech pozorování, \bar{y}_i je průměr i -té skupiny, Y_{ij} je j -té pozorování z i -té skupiny [11].

U testování hypotéz pro jediný výběr byl v této diplomové práci využit Studentův jednovýběrový t -test. Při aplikaci t -testu je nutné znát střední hodnotu μ základního souboru, kterou lze považovat za konstantu

$$H_0: \mu_0 = \text{konstanta} \quad (3.5)$$

V samotném experimentu se testuje hypotéza, zda střední hodnota normálního rozdělení, z něhož výběr pochází, se rovná známé konstantě. Testujeme tedy zda rozdíl získaných hodnot a skutečné hodnoty je způsoben pouze náhodnými chybami. Získaná hodnota T je porovnána s tabulkovou hodnotou T_{krit} pro daný počet stupňů volnosti při hladině významnosti α . Nulová hypotéza je odmítnuta tehdy, pokud vypočtená T hodnota je vyšší než tabulková hodnota pro daný počet stupňů volnosti ($\alpha = 0,005$) [11]. U Studentova jednovýběrového t -testu byly použity následující vztahy

$$T = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s} \sqrt{n} \quad (3.6)$$

$$v = n - 1 \quad (3.7)$$

kde \bar{x} je průměr výběrového souboru, μ_0 je střední hodnota základního souboru, s je výběrová směrodatná odchylka, n je počet členů výběrového souboru a v je počet stupňů volnosti při dané hladině významnosti α [11].

V této diplomové práci bylo statistické zhodnocení dat provedeno pomocí programu Excel na hladině významnosti 95 %.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení paracetamolu

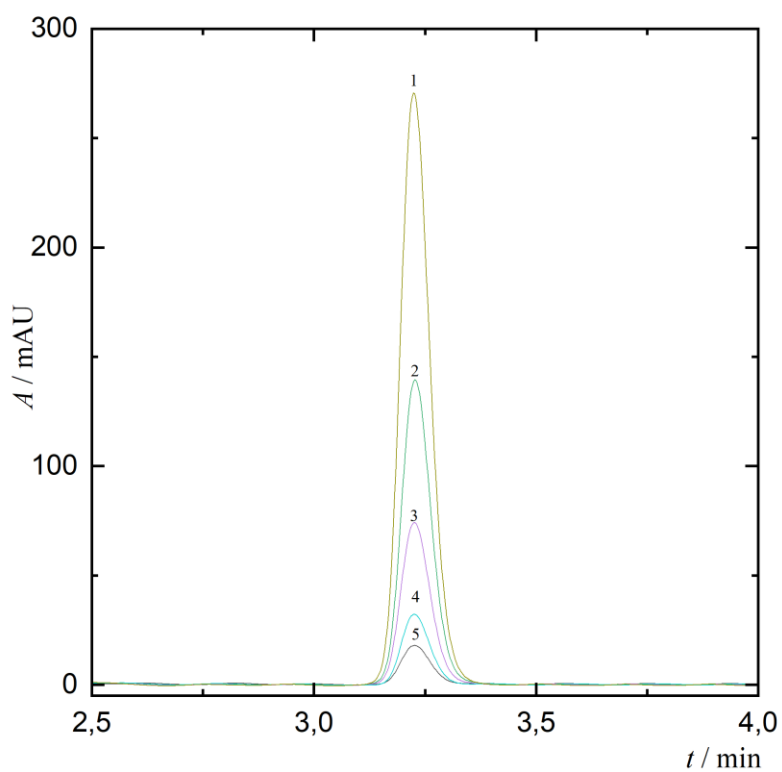
4.1.1 Kalibrační závislost založená na CRMP

Na obr. 4.1 jsou zobrazeny chromatogramy s UV detekcí při stanovení CRMP v roztocích o koncentracích 5,00, 10,00, 25,00, 50,00 a 100,0 mg dm⁻³. Retenční čas paracetamolu za zvolených experimentálních podmínek činil 3,2 minut. Změřené hodnoty ploch chromatografických píků při těchto koncentracích jsou zaznamenány v tab. 4.1. Vypočítané průměry ze třech opakování, které jsou zaznamenány v téže tabulce, jsou využity k sestrojení kalibrační závislosti, znázorněné na obr. 4.2. Jednotlivé směrnice všech třech opakování jsou zaznamenány v tab. 4.2. V tabulce jsou dále vypsány nejistoty směrnic, úseky, nejistoty úseků a koeficienty determinace. Hodnoty úseků byly statisticky nevýznamné.

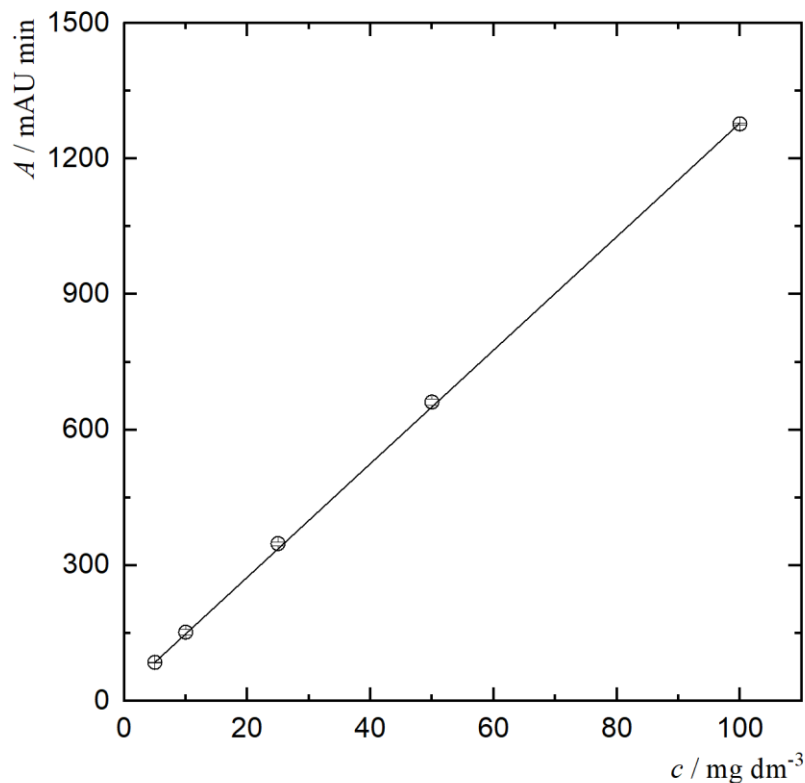
Tabulka 4.1

Plochy chromatografických píků [mAU min] pro jednotlivé koncentrace CRMP.

Opakování	<i>c</i> / mg dm ⁻³				
	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0
1.	84,0	147,8	344,3	655,3	1273,5
2.	84,6	147,6	345,8	657,9	1276,8
3.	86,2	161,3	353,4	670,4	1280,2
Průměr	84,9	152,3	347,8	661,2	1276,8



Obr. 4.1 Chromatogramy s UV detekcí při měření roztoků s rozdílnou koncentrací CRMP při 244 nm. (1) 100,0 mg dm⁻³, (2) 50,0 mg dm⁻³, (3) 25,0 mg dm⁻³, (4) 10,0 mg dm⁻³, (5) 5,0 mg dm⁻³. Podmínky při HPLC stanovení: kolona XBridge BEH C-18 (100×3,5 mm: 2,5 μm), teplota kolony 35 °C. Mobilní fáze: voda (pH = 2,5, upraveno pomocí kyseliny fosforečné) a acetonitril (3:1), isokratická eluce, průtok 0,4 ml min⁻¹, nástřik vzorku 2 μl.



Obr. 4.2 Kalibrační závislost plochy chromatografického píku na koncentraci CRMP. Podmínky při HPLC stanovení: kolona XBridge BEH C-18 (100×3,5 mm: 2,5 μm), teplota kolony 35 °C. Mobilní fáze: voda (pH = 2,5, upraveno pomocí kyseliny fosforečné) a acetonitril (3:1), isokratická eluce, průtok 0,4 ml min⁻¹, nástřik vzorku 2 μl .

Tabulka 4.2

Směrnice, úseky a jejich nejistoty pro tři kalibrační závislosti založené na CRMP.

opakování	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$b / \text{mAU min}$	$s_b / \text{mAU min}$	R^2
1.	12,5	0,07	25,6	3,6	0,9999
2.	12,5	0,08	25,9	3,9	0,9999
3.	12,5	0,13	34,8	6,5	0,9997

Získaná směrnice z rovnice kalibrační závislosti nabývá hodnoty 12,5 mAU min mg⁻¹ dm³. Tato hodnota je v následujícím statistickém vyhodnocování hypotéz využita jako skutečná střední hodnota μ_0 . Úsek této kalibrační závislosti je statisticky nevýznamný.

4.1.2 Kalibrační závislost založená na RMP

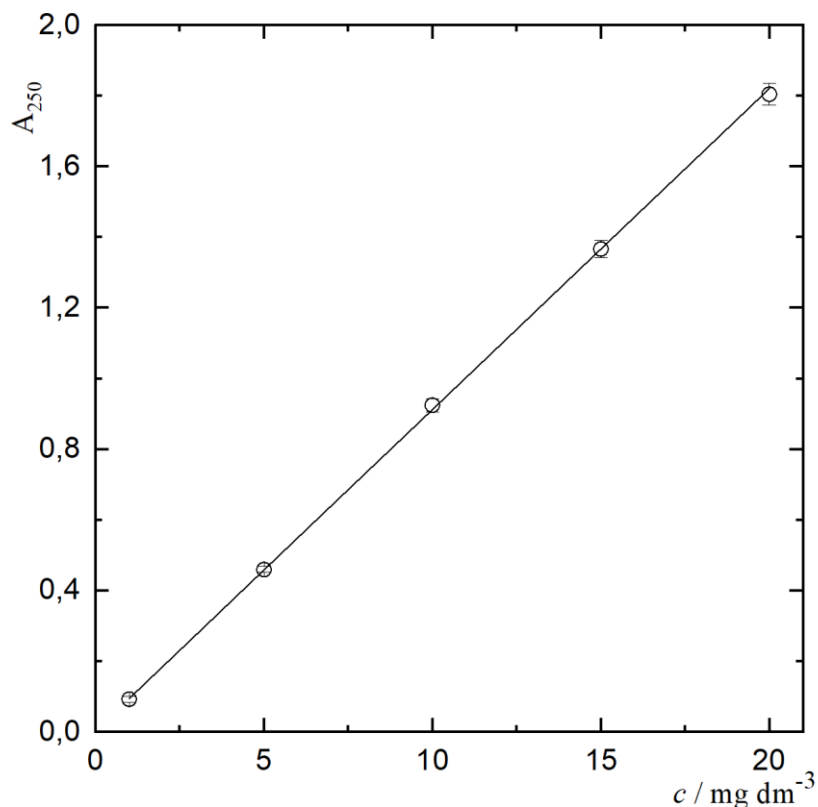
4.1.2.1 Spektrometrická stabilita roztoku RMP

Stabilita roztoku RMP rozpuštěného v methanolu byla v této diplomové práci testována pomocí metody molekulové absorpční spektrometrie v UV oblasti. V tab. 4.3 jsou zaznamenány absorbance při vlnové délce 250 nm. Měření bylo provedeno po dobu třech měsíců, a to celkově devětkrát. V tab. 4.3 jsou vypsány všechny změřené absorbance pro jednotlivé koncentrace. V tabulce jsou zaznamenány směrnice spolu s jejich nejistotami pro devět měření a taktéž průměry absorbancí pro jednotlivé koncentrace spolu s jejich směrodatnými odchylkami. Úseky lineárních regresí byly statisticky nevýznamné. Průměry a směrodatné odchylky jsou využity k sestavení kalibrační závislosti znázorněné na obr. 4.3, kde směrodatné odchylky slouží jako chybové úsečky. Ze získaných směrnic devíti kalibrací po dobu třech měsíců je zřejmé, že v roztoku nedochází k žádným reakcím, které by měly vliv na spektrometrickou stabilitu vzorku.

Tabulka 4.3

Změřené absorbance pro roztoky RMP v rozsahu koncentrací 1–20 g dm⁻³. V tabulce jsou zaznamenány absorbance při vlnové délce 250 nm pro celkem devět opakování a taktéž směrnice devíti kalibrací spolu s jejich nejistotami. Úseky lineárních regresí byly statisticky nevýznamné. Dále průměry získané ze všech hodnot absorbancí pro jednotlivé koncentrace ($s \leq 0,08$).

Počet dní od přípravy	Absorbance roztoku při koncentraci					$a / \text{dm}^3 \text{ mg}^{-1}$	$s_a / \text{dm}^3 \text{ mg}^{-1}$
	1,0 mg dm ⁻³	5,0 mg dm ⁻³	10,0 mg dm ⁻³	15,0 mg dm ⁻³	20,0 mg dm ⁻³		
0	0,07	0,44	0,88	1,30	1,75	0,09	0,0007
20	0,09	0,46	0,92	1,37	1,81	0,09	0,0006
68	0,09	0,47	0,93	1,36	1,81	0,09	0,0007
69	0,09	0,46	0,92	1,37	1,80	0,09	0,0007
70	0,09	0,45	0,91	1,35	1,80	0,09	0,0004
71	0,08	0,46	0,90	1,33	1,77	0,09	0,0007
75	0,10	0,47	0,93	1,38	1,85	0,09	0,0004
76	0,10	0,47	0,95	1,38	1,76	0,09	0,0022
77	0,10	0,47	0,93	1,38	1,83	0,09	0,0005
Průměr	0,09	0,46	0,92	1,37	1,80	–	–



Obr. 4.3 Závislost absorbance při 250 nm na koncentraci RMP v prostředí methanolu (tloušťka absorbující vrstvy 1,0 cm). K sestrojení křivky jsou využity průměry absorbancí z celkově devíti měření.

4.1.2.2 Naměřená data pro sestrojení kalibračních závislostí RMP

Schéma přípravy kalibrací u RMP je znázorněno v tab. 4.4. Toto schéma bylo aplikováno pro 100%, 110% a 90% RMP. Nejprve byl každý zásobní roztok připraven třikrát neboli u každého zásobního roztoku byly odváženy tři navážky. Z jednotlivých zásobních roztoků RMP byly připraveny tři kalibrační sady, které byly pomocí přístroje HPLC změřeny vždy třikrát. Celkově tedy bylo získáno 27 kalibračních závislostí. V následujících tabulkách (tab. 4.5, tab. 4.6 a tab. 4.7) jsou zaznamenány údaje získané ze všech 27 kalibračních závislostí pro 90%, 100% a 110% RMP. V tabulce jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficienty determinace pro jednotlivé kalibrace. U všech kalibrací byly hodnoty úseků statisticky zanedbatelné.

Tabulka 4.4

Schéma přípravy kalibrací u RMP.

Navážka	Kalibrační sada	Měření	Označení kalibrace
1.	1.	1.	1.1.1
		2.	1.1.2
		3.	1.1.3
	2.	1.	1.2.1
		2.	1.2.2
		3.	1.2.3
	3.	1.	1.3.1
		2.	1.3.2
		3.	1.3.3
2.	1.	1.	2.1.1
		2.	2.1.2
		3.	2.1.3
	2.	1.	2.2.1
		2.	2.2.2
		3.	2.2.3
	3.	1.	2.3.1
		2.	2.3.2
		3.	2.3.3
3.	1.	1.	3.1.1
		2.	3.1.2
		3.	3.1.3
	2.	1.	3.2.1
		2.	3.2.2
		3.	3.2.3
	3.	1.	3.3.1
		2.	3.3.2
		3.	3.3.3

Tabulka 4.5

Kalibrace získané ze zásobního roztoku 90% RMP. V tabulce jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficient determinace pro jednotlivé kalibrace.

Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$b / \text{mUA min}$	$s_b / \text{mUA min}$	R^2
1.1.1	11,3	0,03	25,7	1,7	1,0000
1.1.2	11,3	0,13	25,0	6,5	0,9996
1.1.3	11,3	0,06	24,0	2,9	0,9999
1.2.1	11,3	0,16	27,9	8,2	0,9994
1.2.2	11,3	0,15	28,7	7,8	0,9995
1.2.3	11,3	0,09	21,0	4,6	0,9998
1.3.1	10,9	0,10	32,7	5,3	0,9997
1.3.2	11,2	0,04	29,7	1,8	1,0000
1.3.3	11,4	0,03	26,9	1,8	1,0000
2.1.1	11,1	0,12	18,9	6,0	0,9997
2.1.2	11,3	0,11	15,6	5,6	0,9997
2.1.3	11,5	0,06	11,4	3,1	0,9999
2.2.1	11,4	0,05	11,2	2,3	1,0000
2.2.2	11,3	0,08	12,6	3,9	0,9999
2.2.3	11,4	0,12	10,4	6,0	0,9997
2.3.1	11,3	0,15	17,1	7,8	0,9995
2.3.2	11,3	0,10	16,5	5,2	0,9998
2.3.3	11,3	0,05	12,7	2,7	0,9999
3.1.1	11,3	0,10	15,1	5,2	0,9998
3.1.2	11,3	0,08	16,7	4,1	0,9998
3.1.3	11,3	0,11	23,2	5,6	0,9997
3.2.1	11,1	0,08	12,0	4,3	0,9998
3.2.2	11,3	0,06	14,8	3,3	0,9999
3.2.3	11,3	0,02	12,8	1,0	1,0000
3.3.1	11,0	0,11	17,7	5,4	0,9997
3.3.2	11,2	0,15	16,0	7,8	0,9995
3.3.3	11,2	0,08	14,6	4,6	0,9999

Tabulka 4.6

Kalibrace získané ze zásobního roztoku 100% RMP. V tabulce jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficienty determinace pro jednotlivé kalibrace.

Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$b / \text{mUA min}$	$s_b / \text{mUA min}$	R^2
1.1.1	12,5	0,05	28,3	2,3	1,0000
1.1.2	12,5	0,07	28,0	3,5	0,9999
1.1.3	12,5	0,07	29,0	3,7	0,9999
1.2.1	12,5	0,14	25,2	7,1	0,9996
1.2.2	12,5	0,11	26,3	5,7	0,9998
1.2.3	12,5	0,07	29,0	3,5	0,9999
1.3.1	12,6	0,09	21,1	4,5	0,9999
1.3.2	12,5	0,07	21,4	3,5	0,9999
1.3.3	12,5	0,08	24,0	4,0	0,9999
2.1.1	12,5	0,06	34,3	3,0	0,9999
2.1.2	12,4	0,05	27,8	2,5	1,0000
2.1.3	12,5	0,07	28,7	3,8	0,9999
2.2.1	12,4	0,10	29,4	5,3	0,9998
2.2.2	12,5	0,06	29,2	3,2	0,9999
2.2.3	12,4	0,04	24,7	2,2	1,0000
2.3.1	12,5	0,04	30,9	2,1	1,0000
2.3.2	12,5	0,13	26,3	6,7	0,9997
2.3.3	12,5	0,07	25,5	3,7	0,9999
3.1.1	12,5	0,08	20,0	4,1	0,9999
3.1.2	12,4	0,03	18,6	1,6	1,0000
3.1.3	12,4	0,07	23,5	3,7	0,9999
3.2.1	12,4	0,11	27,7	5,7	0,9998
3.2.2	12,4	0,06	23,8	3,1	0,9999
3.2.3	12,5	0,15	25,0	7,7	0,9996
3.3.1	12,4	0,11	16,5	5,8	0,9998
3.3.2	12,5	0,11	16,6	5,6	0,9998
3.3.3	12,5	0,19	11,4	9,6	0,9993

Tabulka 4.7

Kalibrace získané ze zásobního roztoku 110% RMP. V tabulce jsou zaznamenány jejich směrnice, nejistoty směrnic, úseky, nejistoty úseků a koeficienty determinace.

Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$b / \text{mUA min}$	$s_b / \text{mUA min}$	R^2
1.1.1	13,7	0,12	32,0	6,4	0,9998
1.1.2	13,7	0,05	25,5	2,5	1,0000
1.1.3	13,7	0,16	34,5	8,1	0,9996
1.2.1	13,7	0,12	30,0	6,0	0,9998
1.2.2	13,7	0,16	28,7	8,3	0,9996
1.2.3	13,7	0,22	32,3	11,4	0,9992
1.3.1	13,7	0,04	49,7	2,0	1,0000
1.3.2	13,7	0,07	50,4	3,6	0,9999
1.3.3	13,8	0,09	43,4	4,8	0,9999
2.1.1	13,8	0,06	24,2	3,0	0,9999
2.1.2	13,7	0,06	27,0	3,3	0,9999
2.1.3	13,8	0,06	28,1	3,2	0,9999
2.2.1	13,8	0,09	21,9	4,5	0,9999
2.2.2	13,7	0,09	23,9	4,6	0,9999
2.2.3	13,8	0,04	26,5	2,2	1,0000
2.3.1	13,7	0,08	27,9	3,9	0,9999
2.3.2	13,7	0,07	24,4	3,6	0,9999
2.3.3	13,4	0,09	23,9	4,7	0,9999
3.1.1	13,8	0,10	28,6	5,1	0,9998
3.1.2	13,8	0,04	24,1	2,3	1,0000
3.1.3	13,7	0,13	28,1	6,7	0,9997
3.2.1	13,8	0,03	16,9	1,8	1,0000
3.2.2	13,8	0,08	22,5	4,1	0,9999
3.2.3	13,7	0,06	19,1	2,9	1,0000
3.3.1	13,7	0,15	20,1	7,8	0,9996
3.3.2	13,8	0,12	15,9	6,1	0,9998
3.3.3	13,9	0,04	10,4	2,3	1,0000

4.1.2.3 Testování shodnosti RM s CRM

Byly připraveny tři zásobní roztoky RMP o stejné koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ (neboli 100% RMP). Z každého zásobního roztoku byly připraveny tři totožné kalibrační řady, které byly změřeny třikrát. Celkově tedy bylo připraveno devět kalibračních sad. Z každé kalibrační sady roztoků byly získány tři hodnoty směrnice, avšak ke statistickému vyhodnocení dat byl využit průměr těchto tří kalibrací, celkově tedy devět hodnot. Všech 27 hodnot, ze kterých bylo získáno devět průměrů, jsou zaznamenány v tab. 4.6.

V tab. 4.8 jsou zaznamenány průměry směrnice z celkově devíti kalibračních sad, které byly změřeny vždy třikrát. Hodnota průměrů směrnice, jako střední hodnota normálního rozdělení, je statisticky porovnána se střední hodnotou základního souboru, která je považována za konstantu. Touto konstantou (skutečnou hodnotou) je v této diplomové práci hodnota průměru směrnice získaná z kalibračních závislostí pro CRMP. V tab. 4.8 jsou dále zaznamenány směrodatné odchylky pro jednotlivé kalibrace, které jsou spolu s průměry směrnice využity k získání T hodnoty pomocí Studentova t -testu. Získané T hodnoty jsou porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou pro dva stupně volnosti při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$). Všechny vypočtené T hodnoty jsou nižší než tabulková kritická hodnota pro tři měření. Pomocí Studentova jednovýběrového t -testu bylo tedy statisticky potvrzeno, že směrnice jednotlivých kalibrací se rovnají konstantě neboli rozdílly získaných hodnot a skutečné hodnoty jsou způsobeny pouze náhodnými chybami. Nulová hypotéza byla tedy potvrzena, respektive je dokázáno, že lze místo CRMP použít RMP.

Tabulka 4.8

Výsledné průměry jednotlivých směrníc kalibrací připravených ze zásobního roztoku RMP o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$. V tabulce jsou dále zaznamenány vypočtené směrodatné odchylky a T hodnoty získané pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Nulová hypotéza je potvrzena v případě, že získaná hodnota T je nižší než tabulková hodnota pro $n - 1$ stupňů volnosti a $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$, $\mu_0 = 12,5 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$).

Kalibrační sada	$a_{\text{průměr}} / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$ T $	H_0
1.1.	12,5	0,01	1,633	Potvrzena
1.2.	12,5	0,02	0,332	Potvrzena
1.3.	12,5	0,05	1,343	Potvrzena
2.1.	12,4	0,04	2,767	Potvrzena
2.2.	12,4	0,06	2,206	Potvrzena
2.3.	12,5	0,03	0,250	Potvrzena
3.1.	12,4	0,06	1,818	Potvrzena
3.2.	12,5	0,06	1,454	Potvrzena
3.3.	12,4	0,07	1,259	Potvrzena

4.1.2.4 Vytyčení mezí pro použitelnost ARM na základě RM

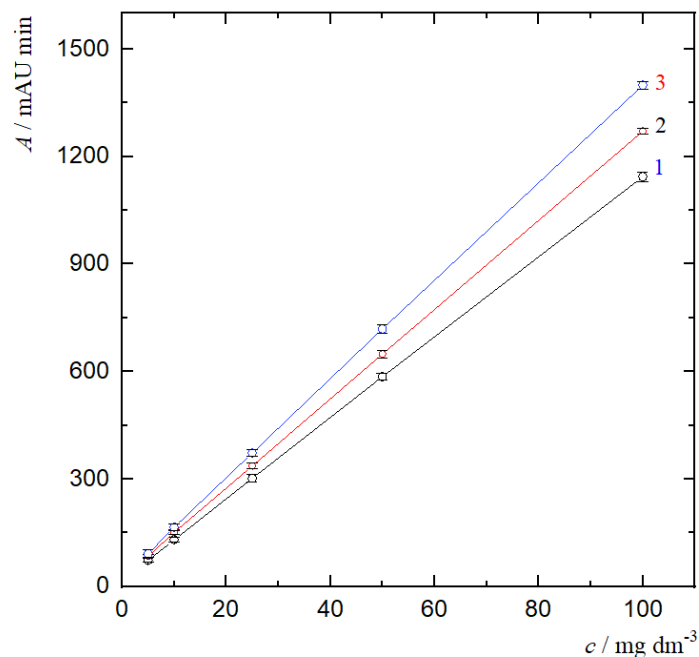
Dle lékopisu se obsah aktivní látky v léčivém přípravku, tedy možnému alternativnímu referenčnímu materiálu, může – jak bylo diskutováno v odst. 2.10.1 – vyskytovat v určitém rozmezí. To samozřejmě bude mít vliv na hodnoty směrnic a úseků kalibračních závislostí sestrojených s pomocí tohoto alternativního materiálu. Proto byly sestrojeny kalibrační závislosti reflektující toto možné rozmezí, které bylo zvoleno na $\pm 10\%$. Byly proto připraveny celkově tři zásobní roztoky RMP, které odpovídají 100 % ($c_1 = 1,00 \text{ g dm}^{-3}$), 110 % ($c_2 = 1,10 \text{ g dm}^{-3}$) a 90 % ($c_3 = 0,900 \text{ g dm}^{-3}$) paracetamolu.

V tab. 4.9 jsou zaznamenány průměry chromatografických ploch pro různé koncentrace roztoků spolu s jejich směrodatnými odchylkami. Jsou zde vypsány průměry ploch pro tři kalibrační závislosti, které jsou totožně připraveny ze zásobních roztoků 100%, 110% a 90% RMP. Hodnoty z tab. 4.9 jsou využity k sestrojení třech kalibračních přímk, které jsou znázorněny na obr. 4.4. Jako chybové úsečky jsou využity směrodatné odchylky pro jednotlivé plochy.

Tabulka 4.9

V tabulce jsou zapsány průměry ploch pro odlišné koncentrace paracetamolu získané ze třech zásobních roztoků RMP o koncentracích: $c_1 = 0,900 \text{ g dm}^{-3}$ (90% RMP), $c_2 = 1,00 \text{ g dm}^{-3}$ (100% RMP), $c_3 = 1,10 \text{ g dm}^{-3}$ (110% RMP). Dále jsou zde zaznamenány směrodatné odchylky pro jednotlivé chromatografické plochy píku.

	$c_{\text{RMP}} / \text{mg dm}^{-3}$	$A / \text{mUA min}$	$s / \text{mUA min}$
90% RMP	5	73,28	5,97
	10	130,69	7,32
	25	302,04	9,95
	50	585,84	9,59
	100	1143,82	12,88
100% RMP	5	84,95	6,00
	10	151,33	6,10
	25	336,87	8,45
	50	648,92	10,09
	100	1271,11	7,16
110% RMP	5	91,52	10,89
	10	165,61	9,80
	25	373,13	8,36
	50	718,91	11,70
	100	1399,41	10,97



Obr. 4.4 Kalibrační závislosti ploch chromatografického píku na koncentraci RMP. K sestavení závislosti jsou využity průměry ploch píku a kalibrační roztoky totožně připravené ze třech zásobních roztoků o odlišné koncentraci (1) 0,900 mg dm⁻³, (2) 1,00 mg dm⁻³, (3) 1,10 mg dm⁻³. Podmínky při HPLC stanovení: kolona XBridge BEH C-18 (100×3,5 mm; 2,5 μm), teplota kolony 35 °C. Mobilní fáze: voda (pH = 2,5, upraveno pomocí kyseliny fosforečné) a acetonitril (3:1), isokratická eluce, průtok 0,4 ml min⁻¹, nástřik vzorku 2 μl.

Získané rovnice kalibrační přímky pro kalibrační roztoky připravené ze zásobního roztoku o koncentraci (úseky byly statisticky zanedbatelné):

1. $c = 0,900 \text{ g dm}^{-3}$ (tj. 90% RMP)

$$A \text{ [mAU min]} = 11,3 c \text{ [mg dm}^{-3}\text{]} \quad (4.1)$$

$$R^2 = 1,0000$$

2. $c = 1,00 \text{ g dm}^{-3}$ (tj. 100% RMP)

$$A \text{ [mAU min]} = 12,5 c \text{ [mg dm}^{-3}\text{]} \quad (4.2)$$

$$R^2 = 1,0000$$

3. $c = 1,10 \text{ g dm}^{-3}$ (tj. 110% RMP)

$$A \text{ [mAU min]} = 13,8 c \text{ [mg dm}^{-3}\text{]} \quad (4.3)$$

$$R^2 = 1,0000$$

4.1.2.5 Testování vlivu měřicího přístroje na parametry kalibračních závislostí pro RMP

Testování vlivu měřicího přístroje na parametry kalibračních závislostí pro RMP bylo statisticky testováno pomocí analýzy rozptylu. Ke statistickému testování bylo využito všech 27 hodnot směrníc. Nulová hypotéza předpokládá, že mezi všemi získanými směrnici není statisticky významný rozdíl, naopak alternativní hypotéza předpokládá, že se alespoň jedna z 27 změřených směrníc statisticky významně odlišuje od ostatních. Z potvrzení nulové hypotézy vyplývá, že měřicí přístroj nemá statisticky významný vliv na konečné hodnoty směrníc.

Všechny získané směrnice kalibrací připravené ze třech odlišných zásobních roztoků jsou zaznamenány v tab. 4.5 (pro 90% RMP), v tab. 4.6 (pro 100% RMP) a v tab. 4.7 (pro 110% RMP). V jednotlivých tabulkách jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficienty determinace pro každou kalibraci. Všechny získané směrnice jednotlivých kalibrací jsou využity k testování nulové hypotézy za pomoci analýzy rozptylu.

V tab. 4.10, 4.11 a 4.12 jsou zaznamenány hodnoty pro součet čtverců (SS), stupně volnosti (rozdíl), výsledné hodnoty pro průměrný čtverec (MS) a hodnoty P . Všechny tři získané hodnoty F jsou nominálně nižší než tabulková kritická hodnota, a tudíž je nulová hypotéza potvrzena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Nulová hypotéza je taktéž potvrzena pomocí p -hodnoty, která také slouží jako číselný indikátor platnosti či neplatnosti nulové hypotézy na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Získané p -hodnoty v této diplomové práci jsou vyšší než hodnota 0,05, a proto taktéž potvrzují nulovou hypotézu. Nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla potvrzena pro všechny kalibrace (27 kalibrací) získané ze třech zásobních roztoků (90% RMP, 100% RMP, 110% RMP). Měřicí přístroj tedy nemá na parametry kalibračních závislostí žádný vliv.

Tabulka 4.10

Hodnoty zajištěné pomocí metody analýzy rozptylu pro všechny směrnice získané ze zásobního roztoku 90% RMP. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty pro součet čtverců (SS), stupně volnosti (rozdíl), výsledné hodnoty pro průměrný čtverec (MS) a hodnota P . Taktéž je zde zaznamenána hodnota testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F_{krit}
Mezi výběry	0,15	8	0,0190	1,45	0,24	2,51
Všechny výběry	0,24	18	0,0131			
Celkem	0,39	26				

Tabulka 4.11

Hodnoty zajištěné pomocí metody analýzy rozptylu pro všechny směrnice získané ze zásobního roztoku 100% RMP. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty pro součet čtverců (SS), stupně volnosti (rozdíl), výsledné hodnoty pro průměrný čtverec (MS) a hodnota P . Taktéž je zde zaznamenána hodnota testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F_{krit}
Mezi výběry	0,04	8	0,005	2,20	0,08	2,51
Všechny výběry	0,04	18	0,002			
Celkem	0,09	26				

Tabulka 4.12

Hodnoty zajištěné pomocí metody analýzy rozptylu pro všechny směrnice získané ze zásobního roztoku 110% RMP. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty pro součet čtverců (SS), stupně volnosti (rozdíl), výsledné hodnoty pro průměrný čtverec (MS) a hodnota P . Taktéž je zde zaznamenána hodnota testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F_{krit}
Mezi výběry	0,11	8	0,014	2,22	0,08	2,51
Všechny výběry	0,11	18	0,006			
Celkem	0,23	26				

4.1.2.6 Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro RM

Příprava kalibračních roztoků, která zahrnuje veškeré pipetování, odečet objemu pomocí rysky a filtrování, je dalším potenciálním zdrojem chyb během analytického měření, který byl v této diplomové práci testován. Statistické testování pomocí analýzy rozptylu bylo provedeno nejprve pro směrnice získané z první kalibrační sady pro každou navážku (celkově devět hodnot směrnic). Dále byl vliv přípravy kalibračních roztoků testován pro druhé a třetí kalibrační sady pro každou navážku, celkově bylo mezi sebou vždy testováno devět hodnot. Toto statistické testování bylo provedeno pro 90%, 100% a 110% RMP. Z každého zásobního roztoku byly tedy celkově získány tři hodnoty F neboli pro každou kalibrační sadu byla získána vlastní hodnota F .

Statistické testování bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu, kde nulová hypotéza předpokládá, že mezi všemi získanými směrnici (devět hodnot) není statisticky významný rozdíl. Naopak alternativní hypotéza předpokládá, že se alespoň jedna z devíti změřených směrnic statisticky významně liší od ostatních. Z potvrzení nulové hypotézy vyplývá, že příprava kalibračních roztoků, tedy pipetování, odečet objemu pomocí rysky a filtrování, nemá statisticky významný vliv na konečné hodnoty jednotlivých směrnic.

A) Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro 90% RMP

V následující tab. 4.13 jsou zaznamenány kalibrace získané ze zásobního roztoku pro 90% RMP. Všechny kalibrace jsou rozděleny do tří skupin, podle kalibračních sad. Analýza rozptylu byla aplikována na každou kalibrační sadu, tedy byly celkově získány tři hodnoty testovacího kritéria F pro 90% RMP. V tab. 4.13 jsou zaznamenány výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami. Úseky kalibrací jsou statisticky zanedbatelné. V tab. 4.14 jsou zaznamenány hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V této tabulce nalezneme hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Všechny tři získané hodnoty F potvrzují nulovou hypotézu, a tudíž bylo statisticky potvrzeno, že příprava roztoků nemá staticky významný vliv na konečné hodnoty směrnic u kalibrací připravené ze zásobního roztoku 90% RMP.

Tabulka 4.13

Výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami pro první, druhé a třetí kalibrační sady (pro tři různé navážky) připravené ze zásobního roztoku 90% RMP

Kalibrační sada	Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$
1.	1.1.1	11,3	0,03
	1.1.2	11,3	0,13
	1.1.3	11,3	0,06
	2.1.1	11,1	0,12
	2.1.2	11,3	0,11
	2.1.3	11,5	0,06
	3.1.1	11,3	0,10
	3.1.2	11,3	0,08
	3.1.3	11,3	0,11
2.	1.2.1	11,3	0,16
	1.2.2	11,3	0,15
	1.2.3	11,3	0,09
	2.2.1	11,4	0,05
	2.2.2	11,3	0,08
	2.2.3	11,4	0,12
	3.2.1	11,1	0,08
	3.2.2	11,3	0,06
	3.2.3	11,3	0,02
3.	1.3.1	10,9	0,10
	1.3.2	11,2	0,04
	1.3.3	11,4	0,03
	2.3.1	11,3	0,15
	2.3.2	11,3	0,10
	2.3.3	11,3	0,05
	3.3.1	11,0	0,11
	3.3.2	11,2	0,15
	3.3.3	11,2	0,08

Tabulka 4.14

Hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Analýza rozptylu byla provedena pro první, druhé a třetí kalibrační sady připravené ze zásobního roztoku 90% RMP pro tři různé navážky ($F_{\text{krit}} = 5,15$).

Kalibrační sada	F	Hodnota P
1.	0,01	0,99
2.	3,37	0,10
3.	1,91	0,23

B) Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro 100% RMP

V následující tab. 4.15 jsou zaznamenány kalibrace získané ze zásobního roztoku pro 100% RMP. Všechny kalibrace jsou rozděleny do tří skupin, podle kalibračních sad. Analýza rozptylu byla aplikována na každou kalibrační sadu, tedy byly celkově získány tři hodnoty testovacího kritéria F pro 100% RMP. V tab. 4.15 jsou zaznamenány výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami. Úseky kalibrací jsou statisticky zanedbatelné. V tab. 4.16 jsou zaznamenány hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V této tabulce nalezneme hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Všechny tři získané hodnoty F potvrzují nulovou hypotézu, a tudíž bylo statisticky potvrzeno, že příprava roztoků nemá staticky významný vliv na konečné hodnoty směrnice u kalibrací připravené ze zásobního roztoku 100% RMP.

Tabulka 4.15

Výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami pro první, druhé a třetí kalibrační sady (pro tři různé navážky) připravené ze zásobního roztoku 100% RMP

Kalibrační sada	Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$
1.	1.1.1	12,5	0,05
	1.1.2	12,5	0,07
	1.1.3	12,5	0,07
	2.1.1	12,5	0,06
	2.1.2	12,4	0,05
	2.1.3	12,5	0,07
	3.1.1	12,5	0,08
	3.1.2	12,4	0,03
	3.1.3	12,4	0,07
2.	1.2.1	12,5	0,14
	1.2.2	12,5	0,11
	1.2.3	12,5	0,07
	2.2.1	12,4	0,10
	2.2.2	12,5	0,06
	2.2.3	12,4	0,04
	3.2.1	12,4	0,11
	3.2.2	12,4	0,06
	3.2.3	12,5	0,15

Kalibrační sada	Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$
3.	1.3.1	12,6	0,09
	1.3.2	12,5	0,07
	1.3.3	12,5	0,08
	2.3.1	12,5	0,04
	2.3.2	12,5	0,13
	2.3.3	12,5	0,07
	3.3.1	12,4	0,11
	3.3.2	12,5	0,11
	3.3.3	12,5	0,19

Tabulka 4.16

Hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Analýza rozptylu byla provedena pro první, druhé a třetí kalibrační sady připravené ze zásobního roztoku 100% RMP pro tři různé navážky ($F_{\text{krit}} = 5,14$).

Kalibrační sada	F	Hodnota P
1.	1,89	0,23
2.	2,08	0,21
3.	2,08	0,21

C) Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro 110% RMP

Směrnice kalibrací připravené ze zásobního roztoku 110% RMP jsou zaznamenány v tab. 4.17. Spolu se směrnicemi jsou v tabulkách vypsány jejich nejistoty. Hodnoty úseků jsou statisticky zanedbatelné. Všechny kalibrace jsou rozděleny do tří skupin, podle kalibračních sad. Analýza rozptylu byla aplikována na každou kalibrační sadu, tedy byly celkově získány tři hodnoty testovacího kritéria F pro 110% RMP. V tab. 4.18 jsou zaznamenány hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V této tabulce nalezneme hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Všechny tři získané hodnoty F potvrzují nulovou hypotézu, a tudíž bylo statisticky potvrzeno, že příprava roztoků nemá staticky významný vliv na konečné hodnoty směrnic u kalibrací připravené ze zásobního roztoku 110% RMP.

Tabulka 4.17

Výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami pro první, druhé a třetí kalibrační sady (pro tři různé navážky) připravené ze zásobního roztoku 110% RMP

Kalibrační sada	Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$
1.	1.1.1	13,7	0,12
	1.1.2	13,7	0,05
	1.1.3	13,7	0,16
	2.1.1	13,8	0,06
	2.1.2	13,7	0,06
	2.1.3	13,8	0,06
	3.1.1	13,8	0,10
	3.1.2	13,8	0,04
	3.1.3	13,7	0,13
2.	1.2.1	13,7	0,12
	1.2.2	13,7	0,16
	1.2.3	13,7	0,22
	2.2.1	13,8	0,09
	2.2.2	13,7	0,09
	2.2.3	13,8	0,04
	3.2.1	13,8	0,03
	3.2.2	13,8	0,08
	3.2.3	13,7	0,06
3.	1.3.1	13,7	0,04
	1.3.2	13,7	0,07
	1.3.3	13,8	0,09
	2.3.1	13,7	0,08
	2.3.2	13,7	0,07
	2.3.3	13,4	0,09
	3.3.1	13,7	0,15
	3.3.2	13,8	0,12
	3.3.3	13,9	0,04

Tabulka 4.18

Hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Analýza rozptylu byla provedena pro první, druhé a třetí kalibrace připravené ze zásobního roztoku 110% RMP pro tři různé navážky ($F_{\text{krit}} = 5,14$).

Kalibrační sada	F	Hodnota P
1.	3,80	0,09
2.	2,46	0,17
3.	2,84	0,14

4.1.2.7 Testování vlivu vážení na parametry kalibrační závislosti pro RMP

Vážení je další proces, který může být potenciálním zdrojem chyb během analytického měření. V této diplomové práci již bylo potvrzeno, že měřicí přístroj ani příprava roztoků nevnáší do analytického procesu žádnou chybu. Jako posledním potenciálním zdrojem chyb je v této diplomové práci staticky testován proces vážení, a to pomocí Studentova jednovýběrového t -testu.

V tab. 4.19 jsou zaznamenány průměry směrnic, které byly vypočítány z kalibrací, které jsou vypsané v prvním sloupci. Hodnota průměrů směrnic, jako střední hodnota normálního rozdělení, je statisticky porovnána se střední hodnotou základního souboru, která je považována za konstantu. Touto konstantou (skutečnou hodnotou) je v této diplomové práci hodnota průměru směrnic získaná z kalibračních závislostí pro CRMP ($\mu_0 = 12,5 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$). V tab. 4.19 jsou dále zaznamenány směrodatné odchylky pro jednotlivé kalibrace, které jsou spolu s průměry směrnic využity k získání T hodnoty pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Získané T hodnoty jsou porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou pro dva stupně volnosti při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2.920$). Všechny vypočtené T hodnoty jsou nižší než tabulková kritická hodnota pro tři měření. Pomocí Studentova jednovýběrového t -testu bylo statisticky potvrzeno, že směrnice jednotlivých kalibrací se rovnají konstantě neboli rozdíly získaných hodnot a skutečné hodnoty jsou způsobeny pouze náhodnými chybami. Pomocí statistické metody bylo potvrzeno, že proces vážení nevnáší do analytického procesu chyby.

Tabulka 4.19

Výsledné průměry směrníc připravených ze zásobního roztoku 100% RMP. První sloupec informuje, jaké kalibrace byly použity pro výpočet $a_{\text{průměr}}$. V tabulce jsou dále zaznamenány vypočtené směrodatné odchylky a T hodnoty získané pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Nulová hypotéza je potvrzena v případě, že získaná hodnota T je nižší než tabulková hodnota pro $n - 1$ stupňů volnosti a $\alpha = 0,05$ ($\nu = 2$, $T_{\text{krit}} = 2,920$, $\mu_0 = 12,5$ mAU min mg^{-1} dm^3)

Kalibrace	$a_{\text{průměr}} / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$ T $	H_0
1.1.1/2.1.1/3.1.1	12,5	0,03	0,958	Potvrzena
1.1.2/2.1.2/3.1.2	12,4	0,06	2,006	Potvrzena
1.1.3/2.1.3/3.1.3	12,5	0,04	2,026	Potvrzena
1.2.1/2.2.1/3.2.1	12,4	0,07	1,861	Potvrzena
1.2.2/2.2.2/3.2.2	12,5	0,05	0,551	Potvrzena
1.2.3/2.2.3/3.2.3	12,5	0,06	0,993	Potvrzena
1.3.1/2.3.1/3.3.1	12,5	0,11	0,466	Potvrzena
1.3.2/2.3.2/3.3.2	12,5	0,02	1,767	Potvrzena
1.3.3/2.3.3/3.3.3	12,5	0,01	1,535	Potvrzena

4.1.3 Kalibrační závislost založená na ARMP

4.1.3.1 Naměřená data pro sestavení kalibračních závislostí ARMP

Testování, které bylo využito u RMP, bylo také aplikováno na možné alternativní referenční materiály paracetamolu, konkrétně na ARMP2. Schéma přípravy kalibrací u ARMP je znázorněno v tab. 4.20. Z léčivého přípravku ARMP2 byly celkově připraveny dva zásobní roztoky o totožné koncentraci ($c = 1,00$ g dm^{-3} , odpovídající 100% RMP). První zásobní roztok byl připraven z jedné tablety, druhý zásobní roztok ze tří tablet, které byly nejprve důkladně rozdrceny a zhomogenizovány. U každého zásobního roztoku se postupovalo totožně, jako u 100% RMP. Nejprve byl každý zásobní roztok připraven třikrát neboli u každého zásobního roztoku byly odváženy tři navážky. Z jednotlivých zásobních roztoků ARMP2 byly připraveny tři kalibrační sady, které byly pomocí přístroje HPLC změřeny vždy třikrát. Celkově tedy bylo získána 27 hodnot směrníc, které byly dále využity ke statistickému testování. V následujících tabulkách (tab. 4.21 a tab. 4.22) jsou zaznamenány údaje získané

ze všech 27 kalibračních závislostí pro zásobní roztok připravený z jedné a ze tří tablet. V tabulce jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficienty determinace pro jednotlivé kalibrace. U všech kalibrací byly hodnoty úseků statisticky zanedbatelné.

Tabulka 4.20

Schéma přípravy kalibrací u ARMP2.

Navážka	Kalibrační sada	Měření	Označení kalibrace	
1.	1.	1.	1.1.1	
		2.	1.1.2	
		3.	1.1.3	
	2.	2.	1.	1.2.1
			2.	1.2.2
			3.	1.2.3
	3.	3.	1.	1.3.1
			2.	1.3.2
			3.	1.3.3
2.	1.	1.	2.1.1	
		2.	2.1.2	
		3.	2.1.3	
	2.	2.	1.	2.2.1
			2.	2.2.2
			3.	2.2.3
	3.	3.	1.	2.3.1
			2.	2.3.2
			3.	2.3.3
3.	1.	1.	3.1.1	
		2.	3.1.2	
		3.	3.1.3	
	2.	2.	1.	3.2.1
			2.	3.2.2
			3.	3.2.3
	3.	3.	1.	3.3.1
			2.	3.3.2
			3.	3.3.3

Tabulka 4.21

Kalibrace získané ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$, který byl připraven z jedné tablety léčivého přípravku ARMP2. V tabulce jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficient determinace pro jednotlivé kalibrace.

Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$b / \text{mAU min}$	$s_b / \text{mAU min}$	R^2
1.1.1	12,5	0,11	28,3	5,5	0,9998
1.1.2	12,5	0,10	34,6	5,1	0,9998
1.1.3	12,5	0,13	27,0	6,8	0,9997
1.2.1	12,5	0,06	26,5	3,1	0,9999
1.2.2	12,6	0,12	30,4	6,1	0,9997
1.2.3	12,5	0,06	32,2	3,0	0,9999
1.3.1	12,5	0,11	19,9	5,8	0,9998
1.3.2	12,5	0,08	14,6	4,1	0,9999
1.3.3	12,5	0,04	16,1	2,3	1,0000
2.1.1	12,5	0,11	24,6	5,9	0,9998
2.1.2	12,5	0,08	30,3	4,1	0,9999
2.1.3	12,5	0,14	29,3	7,0	0,9996
2.2.1	12,6	0,08	32,9	3,9	0,9999
2.2.2	12,5	0,08	39,3	4,2	0,9999
2.2.3	12,6	0,10	38,7	5,3	0,9998
2.3.1	12,4	0,25	40,2	13,0	0,9988
2.3.2	12,4	0,17	34,8	8,6	0,9995
2.3.3	12,5	0,16	27,9	8,4	0,9995
3.1.1	12,6	0,14	17,3	7,1	0,9996
3.1.2	12,5	0,04	22,0	1,8	1,0000
3.1.3	12,5	0,12	17,3	6,3	0,9997
3.2.1	12,3	0,09	30,9	4,5	0,9998
3.2.2	12,5	0,07	29,0	3,8	0,9999
3.2.3	12,5	0,07	26,2	3,7	0,9999

Tabulka 4.22

Kalibrace získané ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$, který byl připraven ze tří tablet ARMP2. V tabulce jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficient determinace pro jednotlivé kalibrace.

Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$b / \text{mAU min}$	$s_b / \text{mAU min}$	R^2
1.1.1	12,6	0,10	26,6	5,4	0,9998
1.1.2	12,5	0,09	24,2	4,6	0,9998
1.1.3	12,5	0,12	27,6	6,2	0,9997
1.2.1	12,5	0,06	30,0	2,9	0,9999
1.2.2	12,5	0,04	29,1	1,8	1,0000
1.2.3	12,3	0,08	27,8	4,1	0,9999
1.3.1	12,5	0,10	30,6	5,2	0,9998
1.3.2	12,4	0,09	27,3	4,4	0,9999
1.3.3	12,2	0,09	27,1	4,7	0,9998
2.1.1	12,6	0,04	25,9	1,8	1,0000
2.1.2	12,4	0,06	25,0	3,1	0,9999
2.1.3	12,5	0,07	20,6	3,6	0,9999
2.2.1	12,5	0,08	20,8	4,3	0,9999
2.2.2	12,5	0,10	22,3	5,3	0,9998
2.2.3	12,5	0,07	16,0	3,4	0,9999
2.3.1	12,6	0,08	24,9	4,1	0,9999
2.3.2	12,6	0,07	26,9	3,8	0,9999
2.3.3	12,6	0,05	20,9	2,8	0,9999
3.1.1	12,5	0,06	21,1	3,1	0,9999
3.1.2	12,5	0,08	27,4	3,9	0,9999
3.1.3	12,5	0,05	24,5	2,8	0,9999
3.2.1	12,5	0,04	27,0	2,3	1,0000
3.2.2	12,4	0,02	32,4	1,1	1,0000
3.2.3	12,1	0,09	16,9	4,5	0,9998
3.3.1	12,5	0,04	25,2	2,1	1,0000
3.3.2	12,5	0,08	33,7	4,1	0,9999
3.3.3	12,5	0,17	24,5	8,8	0,9994

4.1.3.2 Testování vlivu měřicího přístroje na parametry kalibračních závislostí pro ARMP2

Testování vlivu měřicího přístroje na parametry kalibračních závislostí pro ARMP2 bylo statisticky testováno pomocí analýzy rozptylu. Analýza rozptylu byla aplikována na oba zásobní roztoky připravené z jedné a ze tří tablet léčivého přípravku ARMP2. Ke statistickému testování bylo využito všech 27 hodnot směrníc, které jsou zaznamenány v tab. 4.21 a tab. 4.22. Nulová hypotéza předpokládá, že mezi všemi získanými směrnici není statisticky významný rozdíl, naopak alternativní hypotéza předpokládá, že se alespoň jedna z 27 změřených směrníc statisticky významně odlišuje od ostatních. Z potvrzení nulové hypotézy vyplývá, že měřicí přístroj nemá statisticky významný vliv na konečné hodnoty směrníc u kalibračních závislostí připravených z ARMP2.

Všechny získané směrnice kalibrací připravené z jedné a ze tří tablet léčivého přípravku ARMP2 jsou zaznamenány v tab. 4.21 (pro jednu tabletu) a v tab. 4.22 (pro tři tablety). V jednotlivých tabulkách jsou zaznamenány směrnice a úseky včetně jejich nejistot a také koeficienty determinace pro každou kalibraci. Všechny získané směrnice jednotlivých kalibrací jsou využity k testování nulové hypotézy za pomoci analýzy rozptylu.

V následujících tab. 4.23 a 4.24 jsou zaznamenány hodnoty pro součet čtverců (SS), stupně volnosti (rozdíl), výsledné hodnoty pro průměrný čtverec (MS) a hodnoty P . Obě získané hodnoty F jsou nominálně nižší než tabulkové kritické hodnoty, a tudíž je nulová hypotéza potvrzena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Nulová hypotéza je taktéž potvrzena pomocí p -hodnoty, která také slouží jako číselný indikátor platnosti či neplatnosti nulové hypotézy na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Získané p -hodnoty v této diplomové práci jsou vyšší než hodnota 0,05, a proto taktéž potvrzují nulovou hypotézu. Nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla potvrzena pro všechny kalibrace (27 kalibrací) získané ze dvou zásobních roztoků připravených z ARMP2. Měřicí přístroj tedy opět nemá na parametry kalibračních závislostí žádný vliv.

Tabulka 4.23

Hodnoty zajištěné pomocí metody analýzy rozptylu pro všechny směrnice získané ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ připraveného z jedné tablety ARMP2. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty pro součet čtverců (SS), stupně volnosti (rozdíl), výsledné hodnoty pro průměrný čtverec (MS) a hodnota P . Taktéž je zde zaznamenána hodnota testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F_{krit}
Mezi výběry	0,05	8	0,007	2,50	0,05	2,51
Všechny výběry	0,05	18	0,003			
Celkem	0,10	26				

Tabulka 4.24

Hodnoty zajištěné pomocí metody analýzy rozptylu pro všechny směrnice získané ze zásobního roztoku připraveného ze tří tablet ARMP2 o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty pro součet čtverců (SS), stupně volnosti (rozdíl), výsledné hodnoty pro průměrný čtverec (MS) a hodnota P . Taktéž je zde zaznamenána hodnota testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F_{krit}
Mezi výběry	0,16	8	0,02	1,67	0,17	2,51
Všechny výběry	0,21	18	0,01			
Celkem	0,37	26				

4.1.3.3 Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro ARMP2

V této diplomové práci bylo statisticky testováno, zdali příprava kalibračních roztoků, která zahrnuje pipetování, odečet objemu pomocí rysky či filtrování, má vliv na vznik chyb v průběhu analytického měření pro ARMP2. Statistické testování pomocí analýzy rozptylu bylo nejprve provedeno pro směrnice získané z prvních kalibrací pro každou navážku (celkově devět hodnot směrnic). Následně byly také testovány směrnice získané z druhé a třetí připravené kalibrační sady pro tři různé navážky, celkově tedy bylo mezi sebou testováno vždy devět hodnot. Toto statistické testování bylo provedeno pro oba zásobní roztoky připravené z jedné a ze tří tablet. Z každého zásobní roztoku byly tedy celkově získány tři hodnoty F neboli pro každou kalibrační sadu byla získána vlastní hodnota F .

Statistické testování bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu, kde nulová hypotéza předpokládá, že mezi všemi získanými směrnici (devět hodnot) není statisticky významný rozdíl. Naopak alternativní hypotéza předpokládá, že se alespoň jedna z devíti změřených směrnic statisticky významně liší od ostatních. Z potvrzení nulové hypotézy vyplývá, že příprava kalibračních roztoků, tedy pipetování, odečet objemu pomocí rysky a filtrování, nemá statisticky významný vliv na konečné hodnoty jednotlivých směrnic. Vyvrácení nulové hypotézy potvrdí alternativní hypotézu, které naopak očekává, že se alespoň jedna z devíti změřených směrnic statisticky významně liší od ostatních.

A) Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro zásobní roztok připravený z jedné tablety ARMP2

V následující tab. 4.25 jsou zaznamenány hodnoty směrnic včetně jejich nejistot. Tab. 4.25 je rozdělena dle kalibračních sad. Analýza rozptylu byla aplikována na každou kalibrační sadu, tedy byly celkově získány tři hodnoty testovacího kritéria F pro zásobní roztok připravený z jedné tablety ARMP2. Úseky kalibrací jsou statisticky zanedbatelné. V tab. 4.26 jsou zaznamenány hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V této tabulce nalezneme hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Všechny tři získané hodnoty F potvrzují nulovou hypotézu, a tudíž bylo statisticky potvrzeno,

že příprava roztoků nemá staticky významný vliv na konečné hodnoty směrnice u kalibrací připravené z jedné tablety ARMP2.

Tabulka 4.25

Výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami pro první, druhé a třetí kalibrační sady připravené ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ připraveného z jedné tablety ARMP2.

Kalibrační sada	Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$
1.	1.1.1	12,5	0,11
	1.1.2	12,5	0,10
	1.1.3	12,5	0,13
	2.1.1	12,5	0,11
	2.1.2	12,5	0,08
	2.1.3	12,5	0,14
	3.1.1	12,6	0,14
	3.1.2	12,5	0,04
	3.1.3	12,5	0,12
	2.	1.2.1	12,5
1.2.2		12,6	0,12
1.2.3		12,5	0,06
2.2.1		12,6	0,08
2.2.2		12,5	0,08
2.2.3		12,6	0,10
3.2.1		12,3	0,09
3.2.2		12,5	0,07
3.2.3		12,5	0,07
3.		1.3.1	12,5
	1.3.2	12,5	0,08
	1.3.3	12,5	0,04
	2.3.1	12,4	0,25
	2.3.2	12,4	0,17
	2.3.3	12,5	0,16
	3.3.1	12,5	0,13
	3.3.2	12,5	0,12
	3.3.3	12,5	0,06

Tabulka 4.26

Hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Analýza rozptylu byla provedena pro první, druhé a třetí kalibrační sady připravené ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ mg dm}^{-3}$ pro tři různé navážky. Tento zásobní roztok byl připraven z jedné tablety ARMP2 ($F_{\text{krit}} = 5,14$).

Kalibrační sada	F	Hodnota P
1.	0,40	0,69
2.	4,86	0,06
3.	1,22	0,36

B) Testování vlivu přípravy kalibračních roztoků na parametry kalibračních závislostí pro zásobní roztok připravený ze tří tablet ARMP2

V následující tabulce (tab. 4.27) jsou zaznamenány výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami pro první, druhé a třetí kalibrační sady získané ze zásobního roztoku připraveného ze tří tablet ARMP2 ($c = 1,00 \text{ g dm}^{-3}$). Analýza rozptylu byla aplikována na každou kalibrační sadu, tedy byly celkově získány tři hodnoty testovacího kritéria F , které jsou zaznamenány v tab. 4.28. Úseky kalibrací jsou statisticky zanedbatelné. Hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu jsou zaznamenány v tab. 4.28. V této tabulce nalezneme hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Všechny získané hodnoty F potvrzují nulovou hypotézu, a tudíž bylo statisticky potvrzeno, že příprava kalibračních roztoků, která zahrnuje pipetování, odečet objemů pomocí rýsky a filtrování, nemá významný vliv na konečné hodnoty směrnice. Z potvrzení nulové hypotézy vyplývá, že příprava roztoků u ARMP2 nevnáší do analytického procesu chyby.

Tabulka 4.27

Výsledné směrnice spolu s jejich nejistotami pro první, druhé a třetí kalibrační sady připravené ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ připraveného ze tří tablet ARMP2

Kalibrační sada	Označení kalibrace	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$
1.	1.1.1	12,6	0,10
	1.1.2	12,5	0,09
	1.1.3	12,5	0,12
	2.1.1	12,6	0,04
	2.1.2	12,4	0,06
	2.1.3	12,5	0,07
	3.1.1	12,5	0,06
	3.1.2	12,5	0,08
	3.1.3	12,5	0,05
2.	1.2.1	12,5	0,06
	1.2.2	12,5	0,04
	1.2.3	12,3	0,08
	2.2.1	12,5	0,08
	2.2.2	12,5	0,10
	2.2.3	12,5	0,07
	3.2.1	12,5	0,04
	3.2.2	12,4	0,02
	3.2.3	12,1	0,09
3.	1.3.1	12,5	0,10
	1.3.2	12,4	0,09
	1.3.3	12,2	0,09
	2.3.1	12,6	0,08
	2.3.2	12,6	0,07
	2.3.3	12,6	0,05
	3.3.1	12,5	0,04
	3.3.2	12,5	0,08
	3.3.3	12,5	0,17

Tabulka 4.28

Hodnoty zjištěné pomocí metody analýzy rozptylu v softwarovém programu Microsoft Excel 2022. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty P , hodnoty testovacího kritéria F spolu s tabulkovou kritickou hodnotou při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Analýza rozptylu byla provedena pro první, druhé a třetí kalibrační sady připravené ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ mg dm}^{-3}$ získaného ze tří tablet ARMP2 ($F_{\text{krit}} = 5,14$).

Kalibrační sada	F	Hodnota P
1.	0,37	0,71
2.	0,83	0,48
3.	3,62	0,09

4.1.3.4 Testování vlivu vážení na parametry kalibračních závislostí pro ARMP2

V této diplomové práci již bylo statisticky potvrzeno, že měřicí přístroj či příprava roztoků během přípravy kalibračních roztoků u ARMP2 nevnáší do analytického procesu chybu. Jako poslední potenciální zdroj chyb je testován proces vážení, a to za pomoci Studentova jednovýběrového t -testu.

V následujících dvou tabulkách (tab. 4.29 a tab. 4.30) jsou zaznamenány průměry směrníc, které byly vypočítány z kalibrací, které jsou vypsány v prvním sloupci. Hodnota průměrů směrníc, jako střední hodnota normálního rozdělení, je statisticky porovnána se střední hodnotou základního souboru, která je považována za konstantu. Touto konstantou (skutečnou hodnotou) je v této diplomové práci hodnota průměru směrníc získaná z kalibračních závislostí pro CRMP ($\mu_0 = 12,5 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$). V tab. 4.29 jsou zaznamenány hodnoty týkající se kalibrací, které byly připraveny z jedné tablety léčivého přípravku, naopak tab. 4.30 informuje o kalibracích, které byly připraveny ze zásobního roztoku zhotoveného ze třech pečlivě zhomogenizovaných tablet. V tabulkách jsou včetně průměru směrníc také zaznamenány směrodatné odchylky pro jednotlivé kalibrace, které jsou spolu s průměry směrníc využity k získání T hodnoty pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Získané T hodnoty jsou porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou pro dva stupně volnosti při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$). Všechny vypočtené hodnoty T mají nominálně nižší hodnotu, než je tabulková kritická hodnota pro tři měření, a tudíž bylo statisticky potvrzeno, že směrnice jednotlivých kalibrací se rovnají konstantě neboli rozdílly získaných hodnot a skutečné hodnoty jsou způsobeny pouze náhodnými chybami. Pomocí statistické metody bylo potvrzeno, že proces vážení nevnáší do analytického procesu žádné chyby, a to pro oba zásobní roztoky připravené z ARMP2.

Tabulka 4.29

Výsledné průměry směrníc připravených ze zásobního roztoku o koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$, který byl zhotoven z jedné tablety ARMP2. V tabulce jsou dále zaznamenány vypočtené směrodatné odchylky a T hodnoty získané pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Nulová hypotéza je potvrzena v případě, že získaná hodnota T je nižší než tabulková hodnota pro $n - 1$ stupňů volnosti a $\alpha = 0,05$ ($v = 2$, $T_{\text{krit}} = 2,920$, $\mu_0 = 12,5 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$).

Kalibrace	$a_{\text{průměr}} / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$ T $	H_0
1.1.1/2.1.1/3.1.1	12,6	0,06	1,615	Potvrzena
1.1.2/2.1.2/3.1.2	12,5	0,02	2,139	Potvrzena
1.1.3/2.1.3/3.1.3	12,5	0,02	1,192	Potvrzena
1.2.1/2.2.1/3.2.1	12,5	0,14	0,057	Potvrzena
1.2.2/2.2.2/3.2.2	12,5	0,03	1,850	Potvrzena
1.2.3/2.2.3/3.2.3	12,5	0,07	0,901	Potvrzena
1.3.1/2.3.1/3.3.1	12,5	0,05	1,396	Potvrzena
1.3.2/2.3.2/3.3.2	12,5	0,06	1,251	Potvrzena
1.3.3/2.3.3/3.3.3	12,5	0,02	1,219	Potvrzena

Tabulka 4.30

Výsledné průměry směrníc získané ze zásobního roztoku připraveného ze tří tablet ARMP2. V tabulce dále nalezneme vypočtené směrodatné odchylky a T hodnoty získané pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Nulová hypotéza je potvrzena v případě, že získaná hodnota T je nižší než tabulková hodnota pro $n - 1$ stupňů volnosti a $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$, $\mu_0 = 12,5 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$, $v = 2$).

Kalibrace	$a_{\text{průměr}} / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$ T $	H_0
1.1.1/2.1.1/3.1.1	12,5	0,08	0,832	Potvrzena
1.1.2/2.1.2/3.1.2	12,5	0,07	0,770	Potvrzena
1.1.3/2.1.3/3.1.3	12,5	0,03	0,241	Potvrzena
1.2.1/2.2.1/3.2.1	12,5	0,04	0,149	Potvrzena
1.2.2/2.2.2/3.2.2	12,5	0,06	1,144	Potvrzena
1.2.3/2.2.3/3.2.3	12,3	0,20	1,598	Potvrzena
1.3.1/2.3.1/3.3.1	12,6	0,07	1,628	Potvrzena
1.3.2/2.3.2/3.3.2	12,5	0,08	0,290	Potvrzena
1.3.3/2.3.3/3.3.3	12,4	0,23	0,552	Potvrzena

4.1.3.5 Nahrazení ARMP za RMP

V této diplomové práci bylo testováno, zdali lze vybrané léčivé přípravky využít jako alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci v analytické chemii. Byly využity čtyři rozdílné léčivé přípravky s odlišným obsahem účinné látky paracetamolu. Tyto léčivé přípravky jsou Panadol Novum 500 mg (ARMP1), Paramax RAPID 500 mg (ARMP2, ARMP3), Paramax RAPID 1 g (ARMP4) a Paralen 500 mg (ARMP5). U léčivého přípravku Paramax RAPID 500 mg byly použity dvě různé šarže, a to z důvodu ověření, že se jednotlivé šarže neliší v obsahu účinné látky. U každého ARMP byly připraveny dva zásobní roztoky o stejné koncentraci ($c = 1,00 \text{ g dm}^{-3}$). První zásobní roztok byl zhotoven z jedné tablety, druhý zásobní roztok byl připraven ze tří tablet, které byly nejprve důkladně rozdrceny a zhomogenizovány. Z každého zásobního roztoku byla připravena jedna kalibrační sada, která byla následně pomocí HPLC přístroje změřena třikrát. Na obr. 4.5 jsou zobrazeny chromatogramy s UV detekcí při stanovení vybraných ARMP ($c_{\text{PAR}} = 25,0 \text{ g dm}^{-3}$).

K prokázání, že lze využít hromadně vyráběné léčivé přípravky jako možný alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci, byly použity průměry směrnic získané z kalibračních závislostí jednotlivých ARMP. Hodnota průměrů směrnic, jako střední hodnota normálního rozdělení, je statisticky porovnána se střední hodnotou základního souboru, která je považována za konstantu. Touto konstantou (skutečnou hodnotou) je v této diplomové práci hodnota průměru směrnic získaná z kalibračních závislostí pro CRMP ($\mu_0 = 12,5 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$).

V tab. 4.31 jsou zaznamenány směrodatné odchylky pro jednotlivé kalibrace, které jsou spolu s průměry směrnic využity k získání T hodnoty pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Získané T hodnoty jsou porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou pro dva stupně volnosti při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$). Všechny vypočtené T hodnoty (s výjimkou ARMP3, počet tablet = 1) vykazují nižší hodnotu, než je tabulková kritická hodnota pro tři měření. Bylo zde tedy statisticky potvrzeno, že směrnice jednotlivých kalibrací se rovnají konstantě. Z toho vyplývá, že lze využít vybrané hromadně vyráběné léčivé přípravky jako alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci.

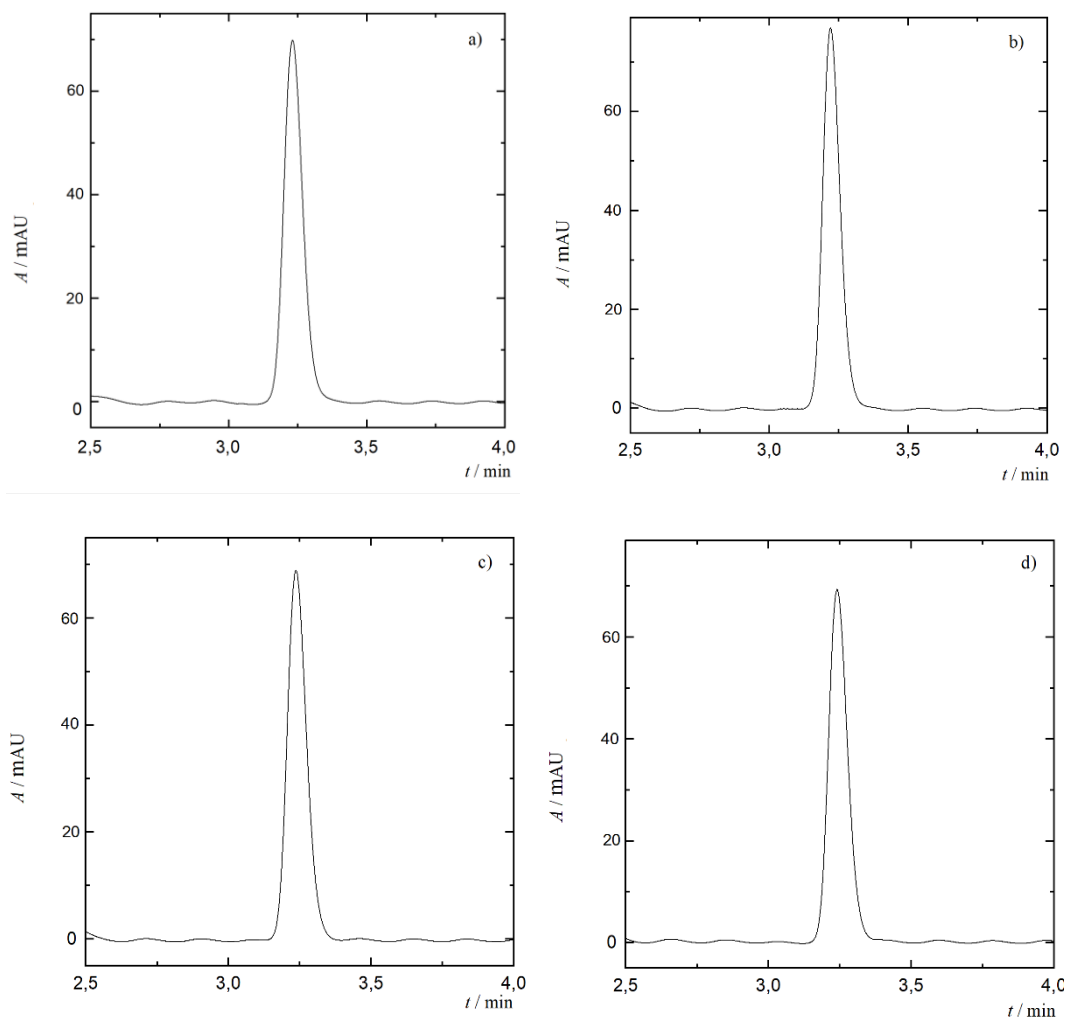
Nulová hypotéza nebyla potvrzena u ARMP3, a to u průměru směrnic, které byly získány ze zásobního roztoku připraveného z jedné tablety přípravku. Ačkoliv z průměru směrnic získaných z druhého zásobního roztoku byla nulová hypotéza potvrzena. Z toho

vyplývá doporučení, že je vhodné vždy použít více tablet, které musí být před přípravou zásobního roztoku důkladně rozdrobeny a zhomogenizovány.

Tabulka 4.31

ARMP a jejich výsledné průměry směrníc. V tabulce jsou dále zaznamenány průměry směrníc spolu se směrodatnými odchylkami, které jsou využity k získání T hodnoty pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Nulová hypotéza je potvrzena v případě, že získaná hodnota T je nižší než tabulková hodnota pro $n - 1$ stupňů volnosti a $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$, $\mu_0 = 12,5 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$, $\nu = 2$).

Materiál, obsah účinné látky	Počet tablet	$a_{\text{průměr}} / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$ T $	H_0
ARMP1, 500 mg/tbt.	1	12,5	0,01	1,120	Potvrzena
	3	12,5	0,03	0,660	Potvrzena
ARMP2, 500 mg/tbt.	1	12,5	0,06	0,586	Potvrzena
	3	12,5	0,12	1,101	Potvrzena
ARMP3, 500 mg/tbt.	1	12,7	0,07	6,231	Nepotvrzena
	3	12,5	0,04	0,157	Potvrzena
ARMP4, 1000 mg/tbt.	1	12,6	0,06	1,859	Potvrzena
	3	12,6	0,06	1,859	Potvrzena
ARMP5, 500 mg/tbt.	1	12,5	0,03	0,896	Potvrzena
	3	12,5	0,01	0,109	Potvrzena



Obr. 4.5 Chromatogramy s UV detekcí při stanovení paracetamolu ($c_{\text{PAR}} = 25,0 \text{ mg dm}^{-3}$). (a) ARMP1, (b) ARMP2, (c) ARMP4, (d) ARMP5. Podmínky při HPLC stanovení: kolona XBridge BEH C-18 (100×3,5 mm; 2,5 μm), teplota kolony 35 °C. Mobilní fáze: voda (pH = 2,5, upraveno pomocí H_3PO_4) a acetonitril (3:1), isokratická eluce, průtok 0,4 ml min^{-1} , nástřik vzorku 2 μl .

4.2 Stanovení kodeinu

4.2.1 Kalibrační závislost založená na RMK

V tab. 4.32 jsou zaznamenány plochy jednotlivých chromatografických píků pro koncentrace 24,0, 45,0, 60,0, 90,0 a 135,0 mg dm⁻³. Vypočítané průměry ze třech opakování, které jsou zaznamenány v téže tabulce, jsou využity k sestrojení kalibrační závislosti znázorněné na obr. 4.6. Jednotlivé směrnice všech třech opakování jsou zaznamenány v tab. 4.33. V tabulce jsou dále vypsány nejistoty směrnic, úseky, nejistoty úseků a koeficienty determinace pro tři opakování. Hodnoty úseků byly statisticky nevýznamné.

Tabulka 4.32

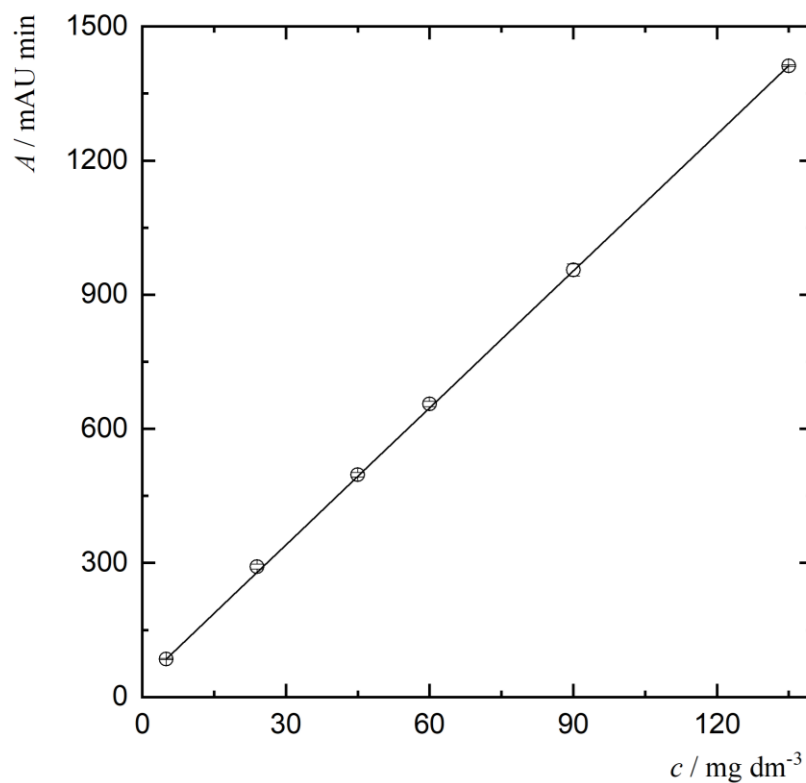
Plochy chromatografických píků [mAU min] pro jednotlivé koncentrace RMK.

Opakování	$c / \text{mg dm}^{-3}$				
	24,0	45,0	60,0	90,0	135,0
1.	294,7	502,3	662,3	966,7	1412,6
2.	294,3	493,6	652,0	958,4	1413,0
3.	291,5	496,9	655,4	955,2	1411,9
Průměr	293,5	497,6	656,6	960,1	1412,5

Tabulka 4.33

Směrnice, úseky a jejich nejistoty pro tři kalibrační závislosti založené na RMK.

Opakování	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{dm}^3$	$b / \text{mAU min}$	$s_b / \text{mAU min}$	R^2
1.	10,1	0,08	41,1	6,7	0,9998
2.	10,1	0,06	52,9	4,7	0,9999
3.	10,1	0,06	45,4	5,2	0,9999



Obr. 4.6 Kalibrační závislost plochy chromatografického píku na koncentraci RMK. Podmínky při HPLC stanovení: kolona XBridge BEH C-18 (100×3,5 mm: 2,5 μm), teplota kolony 35 °C. Mobilní fáze: voda (pH = 2,5, upraveno pomocí H_3PO_4) a acetonitril (9:1), isokratická eluce, průtok 0,4 ml min^{-1} , nástřik vzorku 5 μl .

Z této kalibrační závislosti byla získána výsledná směrnice, jenž nabývá hodnoty 10,1 $\text{mAU min mg}^{-1} \text{dm}^3$. Tato hodnota je v následujícím statistickém vyhodnocování hypotéz využita jako skutečná střední hodnota μ_0 . Úsek této kalibrační závislosti je statisticky nevýznamný.

4.2.1.1 Nahrazení ARMK za RMK

V této diplomové práci byl testován hromadně vyráběný léčivý přípravek s obsahem účinné látky kodein, jako alternativní zdroj referenčních materiálů pro kalibraci v analytické chemii. Byl vybrán léčivý přípravek, a to konkrétně Codein Slovakofarma, značený jako ARMK1. U tohoto léčivého přípravku byly připraveny dva zásobní roztoky o stejné koncentraci ($c_{\text{KOD}} = 0,300 \text{ g dm}^{-3}$). První zásobní roztok byl zhotoven z jedné tablety, druhý zásobní roztok byl připraven ze tří tablet, které byly nejprve důkladně rozdrobeny a zhomogenizovány. Z každého zásobního roztoku byla připravena jedna kalibrační sada, která následně byla vždy třikrát proměřena pomocí HPLC přístroje.

K prokázání, že lze využít ARMK1 jako alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci, byly použity průměry směrnice získané ze tří kalibračních závislostí. Hodnota průměrů směrnice, jako střední hodnota normálního rozdělení, je statisticky porovnána se střední hodnotou základního souboru, která je považována za konstantu ($\mu_0 = 10,1 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$). V tab. 4.34 jsou zaznamenány směrodatné odchylky pro jednotlivé kalibrace, které jsou spolu s průměry směrnice využity k získání T hodnoty pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Získané T hodnoty jsou porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou pro dva stupně volnosti při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$). Všechny vypočtené T hodnoty vykazují nižší hodnotu, než je tabulková kritická hodnota pro tři měření. V této diplomové práci bylo tedy statisticky potvrzeno, že směrnice jednotlivých kalibrací se rovnají konstantě neboli nulová hypotéza byla potvrzena. Z toho vyplývá, že lze využít ARMK1 jako alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci.

Tabulka 4.34

Výsledné průměry směrnice a jejich směrodatné odchylky pro dva zásobní roztoky připravené z jedné a ze tří tablet ARMK1. Průměry směrnice spolu se směrodatnými odchylkami jsou využity k získání T hodnoty pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Nulová hypotéza je potvrzena v případě, že získaná hodnota T je nižší než tabulková hodnota pro $n - 1$ stupňů volnosti a $\alpha = 0,05$ ($\nu = 2$, $T_{\text{krit}} = 2,920$, $\mu_0 = 10,1 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$).

Počet tablet	$a_{\text{průměr}} / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$ T $	H_0
1	10,1	0,01	0,144	Potvrzena
3	10,1	0,01	0,976	Potvrzena

4.3 Simultánní stanovení paracetamolu a kodeinu

Alternativní referenční materiál (ARMPK1) Talvosilen ve svém složení obsahuje obě zmíněné účinné látky, a to paracetamol a kodein. Z důvodu změn v experimentálních podmínkách, týkajících se poměru mobilní fáze a nástřikového objemu, muselo dojít k opětovnému měření kalibrační závislosti u CRMP. CRMP byl změřen za stejných podmínek jako RMK ($V_{\text{nástřik}} = 2 \mu\text{l}$). U RMK nedošlo k žádné změně, tudíž je využita již změřená kalibrační závislost.

4.3.1 Kalibrační závislost založena na CRMP

V tab. 4.35 jsou zaznamenány získané plochy chromatografických píků pro různé koncentrace CRMP a jejich průměry, které jsou využity k sestrojení kalibrační závislosti znázorněné na obr. 4.7. Jednotlivé směrnice všech třech opakování jsou zaznamenány v tab. 4.36. V tabulce jsou dále vypsány nejistoty směrnice, úseky, nejistoty úseků a koeficienty determinace. Hodnoty úseků byly statisticky nevýznamné.

Tabulka 4.35

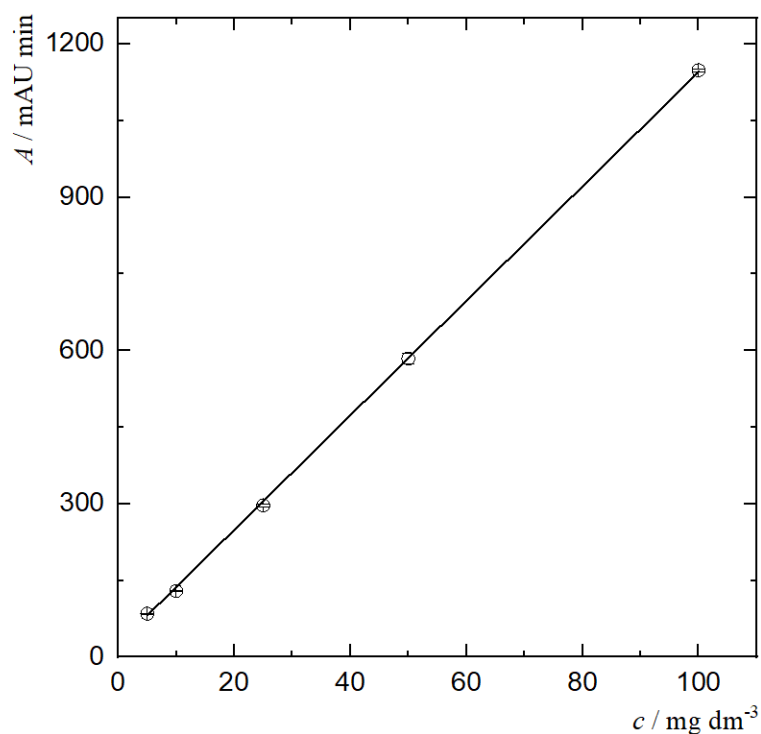
Plochy chromatografických píků [mAU min] pro jednotlivé koncentrace CRMP.

Opakování	$c / \text{mg dm}^{-3}$				
	24,0	45,0	60,0	90,0	135,0
1.	75,8	130,1	294,1	572,1	1147,5
2.	80,1	130,8	298,4	593,4	1146,8
3.	82,2	127,4	298,2	587,0	1151,5
Průměr	79,3	129,4	296,9	584,2	1148,6

Tabulka 4.36

Směrnice, úseky a jejich nejistoty pro tři kalibrační závislosti založené na CRMP.

Opakování	$a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$s_a / \text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	$b / \text{mAU min}$	$s_b / \text{mAU min}$	R^2
1.	11,3	0,07	15,1	3,8	0,9999
2.	11,3	0,08	21,1	4,1	0,9999
3.	11,3	0,07	19,0	3,5	0,9999



Obr. 4.7 Kalibrační závislost plochy chromatografického píku na koncentraci CRMP. Podmínky při HPLC stanovení: kolona XBridge BEH C-18 (100×3,5 mm: 2,5 μm), teplota kolony 35 °C. Mobilní fáze: voda (pH = 2,5, upraveno pomocí H_3PO_4) a acetonitril (9:1), isokratická eluce, průtok 0,4 ml min^{-1} , nástřik vzorku 2 μl .

Získaná směrnice z rovnice kalibrační závislosti nabývá hodnoty 11,3 $\text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$. Tato hodnota je v následujícím statistickém vyhodnocování hypotéz využita jako skutečná střední hodnota μ_0 . Úsek této kalibrační závislosti je statisticky nevýznamný.

4.3.2 Kalibrační závislost založená na ARMPK

V této diplomové práci byl testován hromadně vyráběný léčivý přípravek s obsahem účinné látky kodein a paracetamol, jako alternativní zdroj referenčních materiálů pro kalibraci v analytické chemii. Byl vybrán léčivý přípravek, a to konkrétně Talvosilen, značený jako ARMPK1. Z důvodu výskytu dvou účinných látek, byly u tohoto léčivého přípravku, připraveny čtyři zásobní roztoky o dvou různých koncentracích. Dva zásobní roztoky, připravené z jedné a ze tří tablet, obsahovaly kodein v koncentraci $0,300 \text{ g dm}^{-3}$. Zbývající dva zásobní roztoky, též připraveny z jedné a ze tří tablet, obsahovaly paracetamol v koncentraci $1,00 \text{ g dm}^{-3}$. Z každého zásobního roztoku byla připravena jedna kalibrační sada, tedy byly celkově z ARMPK1 připraveny čtyři kalibrační sady, které byly vždy změřeny třikrát.

K prokázání, že lze využít ARMPK1 jako alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci, byly použity průměry směrnice získané ze tří kalibračních závislostí. Hodnota průměrů získaných směrnice, jako střední hodnota normálního rozdělení, je statisticky porovnána se střední hodnotou základního souboru, která je považována za konstantu ($\mu_{0, \text{RMK}} = 10,1 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$, $\mu_{0, \text{CRMP}} = 11,3 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$). V tab. 4.37 jsou zaznamenány směrodatné odchylky pro jednotlivé kalibrace, které jsou spolu s průměry směrnice využity k získání T hodnoty pomocí Studentova jednovýběrového t -testu. Získané T hodnoty jsou porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou pro dva stupně volnosti při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($T_{\text{krit}} = 2,920$). Všechny vypočtené T hodnoty vykazují nižší hodnotu, než je tabulková kritická hodnota pro tři měření. V této diplomové práci bylo tedy statisticky potvrzeno, že směrnice jednotlivých kalibrací se rovnají konstantě neboli nulová hypotéza byla potvrzena. Z toho plyne, že lze využít ARMPK1 jako alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci.

Tabulka 4.37

Výsledné průměry směrnice spolu s jejich nejistotami pro ARMPK1. V tabulce jsou dále zaznamenány T hodnoty získány pomocí Studentova jednovýběrhového t -testu. Nulová hypotéza je potvrzena v případě, že získaná hodnota T je nižší než tabulková hodnota pro $n - 1$ stupňů volnosti a $\alpha = 0,05$ ($\nu = 2$, $T_{\text{krit}} = 2,920$, $\mu_{0,\text{CRMK}} = 10,1 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$, $\mu_{0,\text{CRMP}} = 11,3 \text{ mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$).

Látka	Počet tablet	\bar{a} / mAU min mg ⁻¹ dm ³	s / mAU min mg ⁻¹ dm ³	$ T $	H_0
Kodein	1	11,3	0,03	0,220	Potvrzena
	3	11,3	0,10	0,081	Potvrzena
Paracetamol	1	10,1	0,02	0,027	Potvrzena
	3	10,1	0,01	2,787	Potvrzena

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo prokázání, zdali lze využít hromadně vyráběné léčivé přípravky jako alternativní zdroj referenčních materiálů pro kalibraci v analytické chemii. Jako možné alternativní zdroje referenčních materiálů byly vybrány léčivé přípravky, a to konkrétně Panadol Novum 500 mg (ARMP1), Paramax RAPID 500 mg (ARMP2, ARMP3), Paramax RAPID 1 g (ARMP4), Paralen 500 mg (ARMP5), Codein Slovakofarma 28,72 mg (ARMK1) a Talvosilen (ARMPK1). Hromadně vyráběný léčivý přípravek Talvosilen obsahuje obě účinné látky, a to paracetamol (500 mg) a kodein (30 mg). U přípravku Paramax RAPID 500 mg byly testovány dvě odlišné šarže (šarže 1113201 a 1111301).

Dále byly statisticky testovány potenciální zdroje chyb během analytického měření, a to u RMP a ARMP2. Případné zdroje chyb, které byly testovány jsou: měřicí přístroj, vážení a příprava kalibračních roztoků, která zahrnuje pipetování, odečet objemů pomocí rýsky a filtrování. Každý jednotlivý potenciální zdroj chyb byl staticky testován na dvou typech zásobních roztoků za pomoci analýzy rozptylu a Studentova jednovýběrového *t*-testu. Bylo zde statisticky potvrzeno, že jednotlivé vybrané procesy nevnáší do analytického postupu chyby.

Závěrem této diplomové práci bylo tedy statisticky potvrzeno, že získané směrnice vybraných alternativních referenčních materiálů jsou shodné se skutečnou hodnotou μ_0 . Z toho vyplývá, že lze využít vybrané hromadně vyráběné léčivé přípravky jako alternativní zdroj referenčních materiálů ke kalibraci v analytické chemii. Jako vhodnou alternativou mohou být v momentech, kdy hraje zásadní roli čas, jako je například klinické vyšetřování intoxikace. Dále z této práce plyne doporučení, že je vhodné vždy použít více tablet, které musí být před přípravou zásobních roztoků důkladně rozdrceny a zhomogenizovány.

Použitá literatura

1. Kościelniak P: *Calibration in Analytical Science: Methods and Procedures*, Germany, Wiley-VCH 2023.
2. Ahmadiyeh F, Sajedi-Amin S, Kafili-Hajlari T, Naseri A: Roadmap for outlier detection in univariate linear calibration in analytical chemistry: Tutorial review. *J. Chemom.* **37** (2022), e3460.
3. Kościelniak P, Wieczorek M. Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. *Anal. Chim. Acta* **944** (2016), 14–28.
4. Český metrologický institut: *Kalibrace*. Dostupné z <https://www.cmi.cz/kalibrace> (cit. 05. 10. 2023).
5. Danzer K: Guidelines for calibration in analytical chemistry. *Pure & Appl. Chem.* **70** (1998), 993–1014.
6. Cuadros-Rodriguez L, Gamiz-Gracia L, Almansa-Lopez E, Laso-Sanchez J: Calibration in chemical measurement processes: I. A metrological approach. *TrAC Trends Anal. Chem.* **20** (2001), 195–207.
7. Raposo F: Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **77** (2016), 167–185.
8. Kościelniak P: Calibration methods in qualitative analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **150** (2022), 116587
9. Valcarcel M, Cardenas S, Gallego, M: Qualitative analysis revisited. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **30** (2000), 345–361.
10. Kościelniak P: Unified principles of univariate analytical calibration. *TrAC Trends Anal. Chem.* **149** (2022), 116547
11. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR: *Analytická chemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2019.
12. Nováková L, Douša M: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Česká chromatografická škola, Brno 2021.
13. Hulanický A: Absolute methods in analytical chemistry. *Pure & Appl. Chem.* **67** (1995), 1905–1911.
14. Ševčík J. G. K.: *Měření a výsledky v analytické chemii*. 2THÉTA, Český Těšín 2009.

15. Český institut pro akreditaci: Dokumenty EA, výběr a užití referenčních materiálů. Dostupné z https://www.cai.cz/?page_id=2965 (cit. 06. 10. 2023).
16. Venelinov T, Sahuquillo A: Optimizing the uses and the costs of reference materials in analytical laboratories. *TrAC Trends Anal. Chem.* **25** (2006), 528–533.
17. International Laboratory Accreditation Cooperation: Guidelines for the selection and use of reference materials. Dostupné z <https://www.demarcheiso17025.com/document/Guidelines%20for%20the%20selection%20and%20use%20of%20reference%20material.pdf> (cit. 25. 10. 2023)
18. Macky LG, Kazlauskas R: The importance of reference materials in doping-control analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **401** (2011), 483–492.
19. ISO Guide 33. Reference materials: Good practice in using reference materials. Vernier, International Organization for Standardization, 2015, 31 s, ICS: 71.040.30.
20. ISO Guide 35. Reference materials: Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Vernier, International Organization for Standardization, 2017, 105 s, ISO/TC 334.
21. Recknagel S, Bresch H, Kipphardt H, Koch M, Rosner M, Reschgenger U: Trends in selected fields of reference material production. *Anal. Bioanal. Chem.* **414** (2022), 4281–4289.
22. Database of References Materials COMAR. Dostupné z <https://www.comar.org> (cit. 20. 03. 2024).
23. Český institut pro akreditaci: Osvědčení o akreditace. Dostupné z <https://www.cmi.cz/sites/all/files/public/download> (cit. 27. 10. 2023).
24. ISO Guide 34. General requirements for the competence of reference material producers. Vernier, International Organization for Standardization, 2016, 34 s, ISO 17034:2016.
25. Zákon č. 378/2007 Sb. Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). Dostupné z <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378> (cit. 11. 11. 2023).
26. Zákon č. 402/2000 Sb. Zákon o léčivech, Dostupné z <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-402> (cit. 11. 11. 2023).
27. Státní ústav pro kontrolu léčiv: Základní informace pro žadatele o registraci léčivého přípravku. Dostupné <https://www.sukl.cz/leciva/informace-pro-zadatele-o-registraci> (cit. 2. 11. 2023)
28. Státní ústav pro kontrolu léčiv: Přehled léčiv. Dostupné https://prehledy.sukl.cz/-prehled_leciv.html (cit. 1. 11. 2023)

29. Chiew AL, Gluud C, Brok J, Buckley NA: Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst Rev.* **2** (2018), CDOO3328.
30. Ayoub S: Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. *Temperature* **8** (2021), 351–371.
31. *Český lékopis 2024*, Grada, Praha 2024.
32. Montaseri H, Forbes P: Analytical techniques for the determination of acetaminophen: A review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **108** (2018), 122–134.
33. Bosch M, Sanchet B, Rojas F, Ojeda C: Determination of paracetamol: Historical evolution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42** (2006), 291–321.
34. Bateman DN, Dear JW: Acetylcysteine in paracetamol poisoning: a perspective of 45 years of use. *Toxicol. Res. (Camb).* **29** (2019), 489–498.
35. Chiew A, Reith D, Pomerleau A, Wong A, Isoardi K, Soderstrom J, Buckley N: Updated guidelines for the management of paracetamol poisoning in Australia and New Zealand. *Med. J. Aust.* **212** (2020), 175–183.
36. Ogemdi I: A review on the properties and uses of paracetamol. *Int. J. Pharm. Chem.* **5** (2019), 31–35.
37. Graham G, Scott K, Day R: Tolerability of paracetamol. *Drug Saf.* **28** (2005), 227–240.
38. Státní ústav pro kontrolu léčiv: PARALEN 500MG. Dostupné https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0254046 (cit. 1. 11. 2023)
39. Státní ústav pro kontrolu léčiv: PANADOL NOVUM 500MG. Dostupné https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0226664 (cit. 1. 11. 2023)
40. Státní ústav pro kontrolu léčiv: PARAMAX RAPID 500MG, Dostupné https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0013623 (cit. 1. 11. 2023)
41. United States Pharmacopoeia Convention: *The United States Pharmacopoeia 44, National Formulary 39. United States Pharmacopoeia Convention*. Rockville 2021.
42. *British Pharmacopoeia*. The Stationery Office, London 2020.
43. *European Pharmacopoeia*. 11th Edition. Strasbourg, 2022.
44. Williams DG, Patel A, Howard RF: Pharmacogenetics of codeine metabolism in an urban population of children and its implications for analgesic reliability. *Br. J. Anaesth.* **89** (2002), 839–845.
45. Pratiwi R, Noviana E, Fauziati R, Carrao DB, Gandhi FA, Majid MA, Saputri FA: A review of analytical methods for codeine determination. *Molecules* **26** (2021), 800–825.
46. Williams DG, Hatch DJ, Howard RF: Codeine phosphate in paediatric medicine. *Br. J. Anaesth.* **86** (2001), 413–421.

47. Drugs and Lactation Database: Codeine. Dostupné <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501212/> (cit. 5.11.2023)
48. Chidambaran V, Sadhasivam S, Mahmoud M: Codeine and opioid metabolism: implications and alternatives for pediatric pain management. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **30** (2017), 349–356.
49. Státní ústav pro kontrolu léčiv: ULTRACOD 500MG/30MG. Dostupné https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0109800 (cit. 10.11.2023)
50. Státní ústav pro kontrolu léčiv: KORYLAN 325MG/28,73MG. Dostupné https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0087906 (cit. 10.11.2023)
51. Státní ústav pro kontrolu léčiv: TALVOSILEN FORTE 500MG/30MG. Dostupné https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0086023 (cit. 10.11.2023)
52. Jakubowska E, Ciepluch N: Blend segregation in tablets manufacturing and its effect on drug content uniformity – A review. *Pharmaceutics* **13** (2021), 1909.
53. Goodwin DJ, Ban S, Denham M, Barylski I: Real time release testing of tablet content and content uniformity. *Int. J. Pharm.* **537** (2018), 183–192.
54. Muselik J, Franc A, Dolezel P, Gonec R, Kronoldova A, Lukasova I: Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharm.* **64** (2014), 355–367.
55. Abdel Hamid MM, Elnabrawi MA, Alanazi FK, Mohamed MI, Sakr AA. Content uniformity testing: suitability of different approaches for marketed low dose tablets. *Pharm. Dev. Technol.* **18** (2013), 1277–1287.
56. Bánfai B, Ganzler K, Kemény S: Content uniformity and assay requirements in current regulations. *J. Chromatogr. A.* **1156** (2007), 206–212.
57. Zaid AN, Al-Ramahi RJ, Ghoush AA, Qaddumi A, Zaaror YA: Weight and content uniformity of lorazepam half-tablets: A study of correlation of a low drug content product. *Saudi. Pharm. J.* **21** (2013), 71–75.
58. Muselík J, Franc A: Hodnocení obsahové stejnoměrnosti tablet s nízkým obsahem léčivé látky s úzkým terapeutickým indexem. *Čes. slov. Farm.* **61** (2012), 271–275.
59. Franc A, Muselík J, Máslová R, Hadrabová J: Obsahová stejnoměrnost směsí a tablet obsahujících warfarin. *Čes. slov. Farm.* **62** (2013), 177–181.
60. Huang Ch, Ku MS: Prediction of drug particle size and content uniformity in low-dose solid dosage forms. *Int. J. Pharm.* **383** (2010), 70–80.

61. Rohrs BR, Amidon GE, Meury RH, Seccrest PJ, King HM, Skoug CJ: Particle size limits to meet USP content uniformity criteria for tablets and capsules. *J. Pharm. Sci.* **95** (2006), 1049–1059.